

特表平7-509616

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)10月26日

(51)Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	8314-4C	
A 6 1 K 48/00			
C 1 2 N 5/10			
	9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
	7729-4B	5/ 00	B.

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 33 頁), 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-500317  
 (86)(22)出願日 平成6年(1994)5月27日  
 (85)翻訳文提出日 平成7年(1995)1月30日  
 (86)国際出願番号 PCT/FR94/00624  
 (87)国際公開番号 WO94/28152  
 (87)国際公開日 平成6年(1994)12月8日  
 (31)優先権主張番号 93/06482  
 (32)優先日 1993年5月28日  
 (33)優先権主張国 フランス(FR)  
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

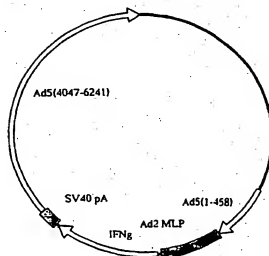
(71)出願人 トランジェヌ、ソシエテ、アノニム  
 フランス国ストラスブル、リュ、ド、モ  
 ルシャイム、11  
 (72)発明者 イムラー、ジャン・リュック  
 フランス国ストラスブル、リュ、デ、ミ  
 ヌーズ、5アー  
 (72)発明者 メタリ、マジッド  
 フランス国ストラスブル、ブルパー  
 ル、トーレ、10  
 (72)発明者 バビラニ、アンドレア  
 フランス国ストラスブル、アブニユ、デ  
 ュ、ジェネラル・ド・ゴール、13  
 (74)代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

(54)【発明の名称】 欠陥アデノウイルスおよび対応補足系

(57)【要約】

宿主細胞または生物における外来ヌクレオチド配列の移入および発現用の新規欠陥アデノウイルス。本発明は新規補足系、これら新規欠陥アデノウイルスの生産方法、治療上のそれら用途と、それらを含有した医薬組成物にも関する。

pTG6303



請求の範囲

1. 複製に欠陥があり、満足細胞中において包膜することができ、5'から3'にかけて5' I.T.R.、包膜化領域、E1A領域、E1B領域、E2領域、E3領域、E4領域および3' I.T.R.を含んだアデノウィルスのゲノムから、

(i) E1A領域の全部または一部、および初期タンパク質をコードするE1B領域の部分の全体、または

(ii) E1A領域の全部または一部、およびE2およびE4領域から選択される少くとも一つの領域の全部または一部、または

(iii) E1A領域の全部または一部、および包膜化領域の部分の欠失により誘導されてなる、アデノウィルスベクター。

2. E1A領域の全部または一部、および初期タンパク質をコードするE1B領域の部分の全体、またはアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項1に記載のアデノウィルスベクター。

3. E3領域の全部または一部、およびE2領域の全部または一部、およびE4領域の全部または一部、およびE1A領域の全部または一部、およびE1B領域の部分の全体、およびE2領域の部分の欠失によりアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項2に記載のアデノウィルスベクター。

4. E2領域の全部または一部、およびE4領域の全部または一部、およびE1A領域の全部または一部、およびE1B領域の部分の欠失によりアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項2

または3に記載のアデノウィルスベクター。

5. E4領域の全部または一部、およびE1A領域の全部または一部、およびE1B領域の部分の欠失によりアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項2～4のいずれか一項に記載のアデノウィルスベクター。

6. E1A領域の全部または一部、およびE2領域の全部または一部、およびE4領域の全部または一部、およびE1A領域の全部または一部、およびE1B領域の部分の欠失によりアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項1に記載のアデノウィルスベクター。

7. E1A領域の全部または一部、およびE4領域の全部または一部、およびE1A領域の全部または一部、およびE1B領域の部分の欠失によりアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項1に記載のアデノウィルスベクター。

8. E1B領域の全部または一部、およびE4領域の全部または一部、およびE1A領域の全部または一部、およびE1B領域の部分の欠失によりアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項6または7に記載のアデノウィルスベクター。

9. E3領域の全部または一部、およびE4領域の全部または一部、およびE1A領域の全部または一部、およびE1B領域の部分の欠失によりアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項6～8のいずれか一項に記載のアデノウィルスベクター。

10. E4領域の全部または一部、およびE1A領域の全部または一部、およびE1B領域の部分の欠失によりアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項6、8または9に記載のアデノウィルスベクター。

11. sp1910: タンパク質をコードするE3領域の部分の欠失によりアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項6、8または9に記載のアデノウィルスベクター。

項3～5、9または10のいずれか一項に記載のアデノウィルスベクター。

12. sp1910: タンパク質をコードするE3領域の部分、宿主細胞において上記タンパク質の発現に連した要素のコントロール下におかれてなる、請求項1に記載のアデノウィルスベクター。

13. E1A領域の全部または一部、および包膜化領域の部分の欠失によりアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項1～12のいずれか一項に記載のアデノウィルスベクター。

14. (i)ヌクレオチド270～ヌクレオチド346、

(ii)ヌクレオチド184～ヌクレオチド273、または

(iii)ヌクレオチド287～ヌクレオチド358にわたる包膜化領域の部分の欠失によりヒトアデノウィルスタイプ5のゲノムから誘導されてなる、請求項13に記載のアデノウィルスベクター。

15. イヌ、トリおよびヒトアデノウィルスから選択されたアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項1～14のいずれか一項に記載のアデノウィルスベクター。

16. ヒトアデノウィルスタイプ5のゲノムから誘導されてなる、請求項15に記載のアデノウィルスベ

クター。

17. 少くともヌクレオチド1634～ヌクレオチド4047にわたるE1B領域の部分の欠失によりヒトアデノウィルスタイプ5のゲノムから誘導されてなる、請求項16に記載のアデノウィルスベクター。

18. 特にヌクレオチド27871～ヌクレオチド30748にわたるE3領域の部分の欠失によりヒトアデノウィルスタイプ5のゲノムから誘導されてなる、請求項16または17に記載のアデノウィルスベクター。

19. エクソチド32800～ヌクレオチド35826にわたるE4領域の部分の欠失によりヒトアデノウィルスタイプ5のゲノムから誘導されてなる、請求項16～18のいずれか一項に記載のアデノウィルスベクター。

20. ウィルスのゲノムの少くとも18%の欠失によりアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項1～19のいずれか一項に記載のアデノウィルスベクター。

21. ウィルスのゲノムの少くとも22%の欠失によりアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項20に記載のアデノウィルスベクター。

22. ウィルスのゲノムの少くとも40%の欠失によりアデノウィルスのゲノムから誘導されてなる、請求項21に記載のアデノウィルスベクター。

23. ウイルスのゲノムの少くとも95%の欠失によりアデノウイルスのゲノムから誘導されてなる、請求項2'2に記載のアデノウイルスベクター。

24. 5'および3' ITRと包膜化領域の全部または一部とを除くアデノウイルスのゲノムの全体の欠失によりアデノウイルスのゲノムから誘導されてなる、請求項23に記載のアデノウイルスベクター。

25. マクレオチド459~358332にわたるウイルスゲノムの部分の欠失によりヒトアデノウイルスタイプ5のゲノムから誘導されてなる、請求項24に記載のアデノウイルスベクター。

26. 外來マクレオチド配列を更に含んでなる、請求項1~25のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター。

27. 発現に必要な要素のコントロール下におかれた対象遺伝子を更に含んでなる、請求項26に記載のアデノウイルスベクター。

28. 非アデノウイルス転写をトランス活性化するタンパク質をコードする遺伝子を更に含んでなり、その遺伝子が宿主細胞で上記タンパク質の発現に必要な要素のコントロール下におかれてなる、請求項26または27に記載のアデノウイルスベクター。

29. 転写をトランス活性化する *Saccharomyces cerevisiae* GalI タンパク質をコードする遺伝子を含ん

でなる、請求項32に記載の補足系。

35. 特に:

(i) アデノウイルスのゲノムのE1A領域の全部または一部、および

(ii) 上記ゲノムのE1B、E2およびE4領域の全部または一部

を含んでなる、請求項32に記載の補足系。

36. 特に、E1A領域の全部または一部、および初期タンパク質をコードするアデノウイルスのゲノムのE1B領域の全体を含んでなる、請求項33~35のいずれか一項に記載の補足系。

37. 特に、イヌ、トリおよびヒトアデノウイルスから選択されるアデノウイルスのゲノムの部分を含んでなる、請求項32~36のいずれか一項に記載の補足系。

38. 特に、ヒトアデノウイルスタイプ5のゲノムの部分を含んでなる、請求項37に記載の補足系。

39. 特に:

(i) マクレオチド100~マクレオチド5297、

(ii) マクレオチド100~マクレオチド4034、または

(iii) マクレオチド505~マクレオチド4034にわたるヒトアデノウイルスタイプ5のゲノムの部分を含んでなる、請求項38に記載の補足系。

40. 特に、マクレオチド32800~マクレオチ

でなる、請求項28に記載のアデノウイルスベクター。

30. 請求項1~29のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクターを含んでなる、アデノウイルス粒子。

31. 請求項1~29のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクターまたは請求項30に記載のアデノウイルス粒子を含んでなる、真核宿主細胞。

32. 特に5' ITR以外のアデノウイルスのゲノムのE1領域の部分を含んだ補足要素を含んでなる補足系であって、

上記補足要素が欠陥アデノウイルスベクターをイントランスで増殖ことができ、上記補足系のゲノムに組み込まれているかまたは発現ベクター中に挿入されてなる、補足系。

33. 特に:

(i) アデノウイルスのゲノムのE1A領域の全部または一部、および

(ii) E1B、E2およびE4領域から選択される上記ゲノムの少くとも1つの領域の全部または一部を含んでなる、請求項32に記載の補足系。

34. 特に:

(i) アデノウイルスのゲノムのE1A領域の全部または一部、および

(ii) 上記ゲノムのE1B、E2およびE4領域のうち少くとも2つの全部または一部

D35826にわたるヒトアデノウイルスタイプ5のゲノムのE4領域の部分を含んでなる、請求項38または39に記載の補足系。

41. 特に、マクレオチド505~マクレオチド35826にわたるヒトアデノウイルスタイプ5のゲノムの部分を含んでなる、請求項38に記載の補足系。

42. 天然プロモーターを欠くアデノウイルスのゲノムのE1A領域の部分を含み、その部分が適切なプロモーターのコントロール下におかれてなる、請求項32~41のいずれか一項に記載の補足系。

43. E1A領域の部分が、非アデノウイルス転写をトランス活性化するタンパク質により誘導しうるプロモーターのコントロール下におかれてなる、請求項42に記載の補足系。

44. E1A領域の部分が、請求項28または29に記載のアデノウイルスベクターによりコードされる転写をトランス活性化するタンパク質により誘導しうるプロモーターのコントロール下におかれてなる、請求項43に記載の補足系。

45. E1A領域の部分が、転写をトランス活性化する *Saccharomyces cerevisiae* GalI タンパク質により誘導しうるプロモーターのコントロール下におかれてなる、請求項43または44に記載の補足系。

46. 選択マーカーをコードする遺伝子を更に含ん

でなる、請求項32～45のいずれか一項に記載の補足系。

47. 選択遺伝子がプロマイシンアセルトランスフェラーゼをコードするものである、請求項46に記載の補足系。

48. 選択遺伝子が、野生型アデノウイルスのゲノムのE1A領域によりコードされる転写をトランス活性化するタンパク質により誘導されるプロモーターのコントロール下、特に上記ゲノムのE2領域のプロモーターのコントロール下におかれてなる、請求項46または47に記載の補足系。

49. 数学的観点から許容される細胞系に由来する、請求項32～48のいずれか一項に記載の補足系。

50. Vero, BHK, A549, MRC5, W138およびCHO系から選択される細胞系に由来する、請求項49に記載の補足系。

51. ヒト胚腎臓細胞に由来する、請求項32～48のいずれか一項に記載の補足系。

52. (i)請求項1～29のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクターが、トランスフェクトされた補足系を得るために、上記アデノウイルスベクターをイントランスで調える補足系中へ導入され、

(ii)上記トランスフェクトされた補足系がアデノウイルス粒子の生産を行うために適した条件下で培養され、

## 明 細 書

### 欠陥アデノウイルスおよび対応補足系

本発明は宿主真核細胞または生物への対象遺伝子の移入と発現が可能な新規欠陥アデノウイルスベクター、およびこれらと組みあてアデノウイルスのゲノムから欠失された必須ウイルス機能をイントランス (in trans) で補う新規補足系に関する。本発明は、特にヒトにおける、遺伝子治療の展望上特別な関心がもたれるものである。

アデノウイルスは広い宿主範囲を示すDNAウイルスである。それらは多数の動物種および多数の細胞で実証されている。ゲノム配列に関して特に異なる多数の血清型が存在する。ほとんどのヒトアデノウイルスはほんのわずかに病原性であり、通常自性の症状を示すだけである。

アデノウイルスは特定レセプターを介して受容宿主細胞に入り、その後それはエンドソーム中に取り込まれる。それらの酸性化が、ウイルスのコンナレーション変化と細胞質中へのその出現に寄与している。複製サイクルの第一工程に必要とされるある種のウイルスタンパク質に關係するウイルスDNAが、次いで感染細胞の核に入り、そこでその転写が細胞酵素により開始される。アデノウイルスDNAの複製は感染細胞の核で起こり、細胞複製

(iii)上記アデノウイルス粒子が細胞培養物中で回収される、

請求項30に記載のアデノウイルス粒子の生産方法。

53. 請求項32～51のいずれか一項に記載の補足系が用いられる、請求項52に記載の方法。

54. 請求項1～29のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター、請求項30に記載されたまたは請求項52または53に記載の方法を用いて得られたアデノウイルス粒子、請求項31に記載の真核宿主細胞、または請求項32～51のいずれか一項に記載の補足系の治療または予防における使用。

55. 請求項1～29のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター、請求項30に記載されたあるいは請求項52または53に記載の方法を用いて得られたアデノウイルス粒子、請求項31に記載の真核細胞、または請求項32～51のいずれか一項に記載の補足系を治療または予防期として、数学的観点から許容されるビヒクルとともに含んでなる、医薬組成物。

を必要としない。新たなビリオンのアセンブリも核で起こる。第一段階において、ウイルスタンパク質は二十面体構造の中空キャプシドを形成するように集合化して、それからアデノウイルスDNAが包膜(enveloped)される。ウイルス粒子またはビリオンが感染細胞から放出され、他の受容細胞に感染することができる。

アデノウイルスの感染サイクルは二つの工程、即ち：  
- アデノウイルスゲノムの複製の開始の前であって、かつウイルスDNAの複製および転写に關与する膜タンパク質の生産が行なわれる前期、および  
- 構造タンパク質の合成を導く後期で生じる。

一般的には、アデノウイルスゲノムは、30以上のタンパク質をコードする配列を含んだ、長さ約3611の二本直鎖DNA分子からなる。その両末端には、ITR (逆方向末端反復) と呼ばれる、血清型に応じた100～150ヌクレオチドの短逆方向配列が存在している。ITRはアデノウイルスゲノムの複製に關与する。約300ヌクレオチドの包膜化領域は、ゲノムの5'末端において5'ITRの直後に位置している。

初期遺伝子は、アデノウイルスゲノム中に分散した、E1～E4 (Eは「初期」を表す) と表示される4領域に分布している。初期領域はそれら自体のプロモーターを有した少くとも6つの転写単位を含んでいる。初期通

遺伝子の発現はそれ自体調節され、一部の遺伝子は他よりも前に発現される。3つの領域E1、E2およびE4は各々のウイルス複製に必須である。このため、アデノウイルスがこれら領域の1つに欠陥がある場合、即ちアデノウイルスがこれら領域の1つによりコードされる少くとも1つのタンパク質を生産できない場合には、このタンパク質はイントランズでそれに供給されねばならない。

E1初期領域はアデノウイルスゲノムの5'末端に位置し、2つのウイルス転写単位E1AおよびE1Bを各々含んでいる。この領域はウイルスサイクルに非常に初期に関与するタンパク質をコードし、アデノウイルスのほぼすべての他の遺伝子の発現にとり必須である。特に、E1A転写単位は、他のウイルス遺伝子の転写をトランス活性化するタンパク質をコードしており、E1B、E2A、E2BおよびE4領域のプロモーターからの転写を調節する。

2つの転写単位E2AおよびE2Bをもまた含んだE2領域の産物は、ウイルスDNAの複製に直接関与している。この領域は、一本鎖DNAと強い親和性を示す72bpのタンパク質と、DNAポリメラーゼの合成とを特に支配している。

E3領域はウイルスの複製にとり必須ではないがアデノウイルス感染の際に宿主免疫反応の阻害に関与する

しい少くとも6つのタンパク質をコードしている。特に、gp190は糖タンパク質は、宿主細胞毒性T細胞による感染細胞の細胞溶解に関与するCTL応答を妨げると思われる。

E4領域はアデノウイルスゲノムの3'末端に位置する。そして、それは後期遺伝子の発現、後期メッセンジャーRNA(mRNA)の安定性、前期から後期への移行、そして更に細胞タンパク質合成の阻害に関与する多数のポリペプチドをコードしている。

ウイルスDNAの複製が開始されると、後期遺伝子の転写が始まる。これらはアデノウイルスゲノムの大部分を占め、初期遺伝子の転写単位と一部重複している。しかし、それらは異なるプロモーターから別のスプライシング模式に従い転写され、そのため同一配列が異なる目的に用いられる。後期遺伝子のほとんどは主要後期プロモーター(MLP)から転写される。このプロモーターは系統一転写産物の合成を行い、その後これは約20のメッセンジャーRNA(mRNA)の形で成熟化され、そこからビリオンのキャプシドタンパク質が生産される。キャプシドを構成する構造タンパク質IIをコードする遺伝子は、アデノウイルスゲノムの5'末端に位置し、その3'末端でE1B領域と重なり、タンパク質II転写単位は、E1B転写単位と同じ転写終止シグナルを

利用している。

いくつかのアデノウイルスは現在遺伝的および生化学的にかなり特徴付けされている。ヒトアデノウイルスタイプ5(Ad5)の場合、その配列は参照番号H1216としてGenbankデータベースで開示されている。アデノウイルスゲノムで異なる遺伝子を正確に位置決めすることができた。そこでは5'から3'にかけて103bp5'LTR、その後に約300bp包膜化領域(Encapsidation, 1997, 1, 1997, 41, 2193-2197)、次いでその位置が図1に示されている初期および後期領域と、最後に3'LTRを含んでいる。

アデノウイルスが、対象遺伝子移入用の選択ベクターとしうる有利な特徴を備えていることは、前期から明らかである。多数の組換えアデノウイルスが文献に記載されている(Eisenfeld et al., 1991, Science, 252, 431-434; Eisenfeld et al., 1992, Cell, 68, 143-155)。一般的に言えば、それらはAd5から誘導され、環境および宿主生物でそれらの伝播を避けるようにE1領域に欠陥がある。加えて、非必須E3領域も欠失させることができる。外來配列が、E1またはE3領域に代えて組み込まれる。

このため、これらの欠陥アデノウイルスは、ウイルス複製に必須であるE1機能をイントランズで補うセルラインでのみ増殖させることができる。現在、使用しう

る唯一の複製系は胚腎臓系293(Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., 36, 59-72)であって、これは特にウイルスゲノムの5'末端を含んだAd5ゲノムの断片の染色体への組込みにより得られ、それによって系293はE1機能に欠陥があるアデノウイルスを誘う。293細胞は欠陥組換えアデノウイルスにおいてまた見出される配列、例えば5'LTRと、包膜化領域と、初期タンパク質をコードする配列を含んだE1B領域の3'末端側の部分とを含んでいる。

アデノウイルスを用いた遺伝子移入の実施の可能性は現在確立されている。しかしながら、それらの安全性の問題はなお解決されていない。実際に、それらは培養で一部の細胞系を形質転換することができ、少くとも一部の血清型において、本質的にE1とおそらくE4領域におけるアデノウイルスゲノムの発現産物の一部のものとしての潜在的な危険性がもたらされる。更に、従来の欠陥アデノウイルス(特に組換えアデノウイルス)と、天然もしくは野生型アデノウイルス(宿主生物の偶発的汚染または日和見感染に起因する)または複製系293に組込まれたアデノウイルスゲノム断片との間の遺伝子組換えの真確性は限々たるものではない。実際に、1回の組換え現象は、E1機能を回復させ、環境に伝播しうる非欠陥組換えアデノウイルスを生じるのに十分である。欠陥アデノウイルスと同様の細胞に同時感染する野生型

天然アデノウイルスがE1領域に関して弱性を備えて、2ウイルスの同時伝播を起こすという状況も考えられる。さらに、一部タイプの真核細胞はE1A増殖性を示すタンパク質を生産し、これはそれらに感染する欠陥アデノウイルスを部分的に補うこともできる。

このため、有効な治療方法がないE1Aの重度の遺伝子欠陥を修正して、ある障害を治療するための遺伝子治療に用いるにあたり、最少の危険性を示し、自由に吸える有用なアデノウイルスベクターが望まれている。ヒトに適用される遺伝子治療の応答は、それを入手できるかどうかに依存している。

更に、系293の入手に関しては疑問が存在している。その疑問により、それは由来するヒト用とされる産物の受容性が損なわれる傾向にある。ヒト用の組織へアデノウイルス粒子を生産するためには、起源および由来が正確に知られている、自由に吸える増殖系があることが有用である。

今般、(1)アデノウイルスゲノムのある特定領域が欠失され、インビボでの外来ヌクレオチド配列の移入により通した新規欠陥アデノウイルスベクター、および(2)高率の観点から許容される、このためヒト用の産物の生産上要求されるすべての安全性を示す、新規の特許付けされた増殖系が見出された。

これら新規ベクターの価値は、それらが1以上の大き

される少なくとも1つの発現産物の生産を妨げる欠失が好ましい。このため、それらはコード領域または調節領域、例えばプロモーター領域に存在してよく、遺伝子の採取性を阻害するかまたはプロモーター領域を無機能化するように少なくとも1つのヌクレオチドに影響を与えてよい。欠失には、上記領域の1以上の遺伝子の部分的欠失またはその領域の全体の部分的欠失も含む。

本発明によるアデノウイルスベクターは複製に欠陥があるが、しかし増殖細胞で複製および包膜することができ、宿主細胞にそのベクターを透過しうる能力を有しているために、宿主細胞で自律複製できないにもかかわらず感染性であるアデノウイルス粒子(欠陥アデノウイルスとも呼ぶこととする)を生じうるように、欠陥があるものに産物をイントランスでそれを提供する。

第一の例によると、本発明によるアデノウイルスベクターは、E1A領域の全部または一部、および初期タンパク質をコードする配列の全体を含んだE1B領域部分の欠失により、天然または野生型アデノウイルスのゲノムから誘導される。好ましい態様によれば、欠失はE1B領域の発現産物(即ち初期タンパク質をコードする配列)とプロモーターとに影響を与え、後期タンパク質IIをコードする配列と重複する転写終結シグナルの全部または一部を含まない。ヒトアデノウイルスタイプ5から誘導される本発明によるアデノウイルスベクターに関し

な対象遺伝子の挿入が可能な高いクロニング能力を示し、かつ使用上最大の安全性を示すことである。有害なウイルスは、対象遺伝子を移入および発現しうるそれらの能力を損うことなく、アデノウイルスを自律複製および細胞形質転換できなくする。

このため、本発明の主題は、複製に欠陥があり、増殖細胞中に包膜することができて、5'から3'にかけて5'LTR、包膜化領域、E1A領域、E1B領域、E2領域、E3領域、E4領域、および3'LTRを含んだアデノウイルスのゲノムから、

- (i) E1A領域の全部または一部、および初期タンパク質をコードするE1B領域の部分全体、または
- (ii) E1A領域の全部または一部、およびE2およびE4領域から選択される少なくとも1つの領域の全部または一部、または
- (iii) E1A領域の全部または一部、および包膜化領域の部分の欠失により誘導される、アデノウイルスベクターである。

本発明の目的において、「欠失」または「欠く」という用語は特約領域における少なくとも1つのヌクレオチドの除去に關し、欠失は当然ながら連続しても不適切でもよい。全部または一部とは、該当する領域の全体または部分のみの場合を意味する。上記領域によりコード

て、上記欠失にはアデノウイルスゲノムのヌクレオチド1534~3509間にある配列から少なくともなり、その配列は参照番号M71116としてGenbankデータベースで開示されている。この欠失の目的は、本発明によるアデノウイルスベクターと、増殖系(例えば系293)に組み込まれるアデノウイルスゲノム断片とに共通した配列を減少または消失させることである。更に、少なくともE1A領域の発現産物と一緒に、発現産物が増殖的に発現性である配列を本発明によるアデノウイルスベクターから除去することである。

しかも、本発明によるアデノウイルスベクターは、天然または野生型アデノウイルスのゲノムから、

- E3領域の、および/または
- E2領域の、および/または
- E4領域の

全部または一部の欠失によって更に誘導される。

本発明によるアデノウイルスベクターが上記3欠失のうち1つ、またはいずれかの組合せでそれらのうち2つ、またはすべての欠失を含むことができることは自明である。

特に有利な態様によると、E3領域の一部のみ、好ましくはE31910:タンパク質、をコードする配列を含まない部分が、本発明によるアデノウイルスベクターから欠失される。本発明によるアデノウイルスベクターに

sp1910: タンパク質をコードする配列が存在することにより、感染細胞は宿主の免疫監視（即ち治療プロトコル）がいくつかの反復投与を要するときの重要な基準）からの脱却が可能である。選択は、sp1910: をコードする配列を、宿主細胞でそれらを発現させる適切な要素、即ちmRNAへの上記配列の転写とタンパク質への後者の翻訳に必要な要素のコントロール下において行うことができる。これらの要素には特にプロモーターがある。このようなプロモーターは当業者に周知であり、遺伝子工学の慣用的技術で上記コード配列の上流に挿入することができる。選択されるプロモーターはE1A領域の発現産物の1つにより活性化されない構成プロモーターであることが好ましい。例として、HMG（ヒドロキシメチルグルタリル縮合酵素）レダクターゼ）遺伝子プロモーター、SV40（シミアンウイルス40）ウイルス初期プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）LTR（長反復末端）または高等真核生物のPGK（ホスホグリセリン酸キナーゼ）遺伝子のプロモーターが挙げられる。

更に、プロモーター領域に相当するE3領域の部分は本発明によるアデノウイルスベクターから場合により欠失させることができ、そのプロモーター領域は上記のような異種プロモーター領域に代えられる。

第二の例によると、本発明によるアデノウイルスベクターは、E1A領域の全部または一部と、少くともE2

および/またはE4領域の全部または一部における連続または不連続欠失により、天然または野生型アデノウイルスのゲノムから誘導される。このような欠失により、対象遺伝子のクロニングの可能性を増加させることができる。更に、E4領域の全部または一部の除去により、潜在的な発癌性産物をコードする配列を減少または消失させることもできる。

上記のように、本発明によるアデノウイルスベクターは、特に上記のような置換に依り、E1Bおよび/またはE3領域の全部または一部を更に欠くことができる（例えば、初期タンパク質をコードする配列の全体を含むE1B領域の部分、およびsp1910: タンパク質をコードしないE3領域の部分の欠失）。

最後に、第三の例によると、本発明によるアデノウイルスベクターは、E1A領域の全部または一部と、包膜化領域の部分の欠失により、アデノウイルスのゲノムから誘導される。

包膜化領域の部分の欠失により、本発明によるアデノウイルスベクターの無制限の伝播の可能性を、野生型アデノウイルスの存在下にあるとき有意に減少させることができる。このような欠失は、野生型アデノウイルスによるベクターの欠陥機能のインテランシ相違によっても、結合野生型アデノウイルスのゲノムと比べて効率的に包膜できないように、その包膜化機能に影響を与えること

ができる。

包膜化領域からの欠失は、2つの基準、即ち包膜される能力の減少と、同時に工業的生産に適合する獲りの効力とに基づいて選択される。換言すれば、本発明によるアデノウイルスベクターの包膜化機能は実質上、但しもっと低い程度に維持される。弱毒化は、慣用的測定技術により、適切な系を感染させて溶解プラークの数を調べることに有利である。このような技術は当業者に知られる。本発明において、包膜化効力は、野生型包膜化領域を有するコントロールアデノウイルスと比較して、2〜50分の1、有利には3〜20分の1、好ましくは5〜10分の1に減少している。

当然ながら、本発明による弱毒化アデノウイルスベクターは上記欠失の少くとも1つまたは何らかの組合せも更に含むことができる。

本発明によるアデノウイルスベクターは、天然または野生型アデノウイルス、有利にはイタ、トリまたはヒトアデノウイルス、好ましくはヒトアデノウイルスタイプ2、3、4、5または7、最も好ましくはヒトアデノウイルスタイプ5（Ad5）のゲノムから誘導される。この後者の場合には、本発明によるアデノウイルスベクターの欠失は参照番号11261としてGenbankデータベースで特定されているAd5ゲノムのヌクレオチドの位置を参照して示される。

ヒトアデノウイルスタイプ5のゲノムから：

(1) E1B領域の初期タンパク質をコードし、ヌクレオチド1634から始まり、ヌクレオチド4047で終わる部分の全体、および/または

(11)ヌクレオチド32800〜35826にわたる

E4領域、および/または

(111)ヌクレオチド27871〜30748にわたる

E3領域の部分、および/または

(111) 下記包膜化領域の部分：

-ヌクレオチド270〜ヌクレオチド346の範囲、

または

-ヌクレオチド184〜ヌクレオチド273の範囲、

または

-ヌクレオチド287〜ヌクレオチド358の範囲

の欠失により誘導される本発明によるアデノウイルスベクターが最も好ましい。

好ましくは、本発明によるアデノウイルスベクターは野生型または天然アデノウイルスのゲノムから、そのゲノムの少くとも18%、少くとも22%、少くとも25%、少くとも30%、少くとも40%、少くとも50%、少くとも60%、少くとも70%、少くとも80%、少くとも90%または少くとも95%、特に98.5%の欠失により誘導される。

特に好ましい態様によると、本発明によるアデノウィ

ルスベクターは、5'および3' ITRと、包膜化領域の全部または一部を除いたアデノウイルスゲノムの全体の欠失により、アデノウイルスのゲノムから誘導される。この例によると、それは組織へのリスクおよび発癌性のリスクを制限して最大のクロニング能力を有するような最少数のウイルス配列のみを含んでいる。このようなベクターは、微小アデノウイルスベクターと称され、301以内の外來ヌクレオチド配列を挿入することが可能である。本発明による好ましいアデノウイルスベクターは、ヌクレオチド459〜35832にわたるウイルスゲノムの部分の欠失により、ヒトアデノウイルスタイプ5から誘導される。

本発明に関して、本発明によるアデノウイルスベクターは、宿主細胞への外來ヌクレオチド配列の移入と、そのその発現をその目的として有する。"外來ヌクレオチド配列"は、コード配列とそのコード配列を発現させる調節配列を含んだ、コード配列がアデノウイルスのゲノムに通常存在しない配列である核酸を意味すると理解されている。調節配列はいかなる組織であってもよい。外來ヌクレオチド配列は、包膜化領域と3' ITRとの間に、遺伝子工学の標準技術で本発明によるアデノウイルスベクター中に導入される。

外來ヌクレオチド配列は対象の、好ましくは治療対象の遺伝子1以上からなる。本発明に関して、対象遺伝子

はアンチセンスRNA、または対象タンパク質に翻訳されるmRNAのいずれかをコードすることがある。対象遺伝子はゲノムタイプ、増殖性DNA (cDNA) タイプまたは混合タイプ (少くとも1つのイントロンが欠失されているミニ遺伝子) である。それは成熟タンパク質、成熟タンパク質の前駆体、特に分節されてこのためシグナルペプチドを含む前駆体、別起原の配列の融合によるキメラタンパク質、あるいは改善または改変された生物学的性質を示す天然タンパク質の変異体をコードすることができる。このような変異体は天然タンパク質をコードする遺伝子の1以上のヌクレオチドの変異、欠失、置換および/または付加により得られる。

対象遺伝子は、宿主細胞でのその発現に適した要素のコントロール下においてよい。"適切な要素"とは、RNA (アンチセンスRNAまたはmRNA) へのその転写とタンパク質へのmRNAの翻訳とに必要な一連の要素を意味すると理解されている。転写に必要な要素の中では、プロモーターが特に重要と思われる。それは構成プロモーターまたは調節プロモーターであって、真核生物またはウイルス組織と更にはアデノウイルス組織の遺伝子から導出することがある。一方、それは該遺伝子に対する対象遺伝子の天然プロモーターであってもよい。一般的に言えば、本発明で用いられるプロモーターは調節配列を含むように修飾してもよい。例として、本発明で使

用の対象遺伝子は、リンパ球宿主細胞へのその移入を目標にすることが望まれるときに、免疫グロブリン遺伝子のプロモーターのコントロール下におかれる。多数の細胞タイプで発現を行う、TK-HSV-1 (ヘルペスウイルス、タイプ1チミンキナーゼ) 遺伝子プロモーター、または一方で特にヒトアデノウイルスタイプ2のアデノウイルスMLPプロモーターも挙げられる。

本発明に関して使用しうる対象遺伝子の中では、以下が挙げられる:

- サイトカイン、例えばインターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\gamma$ 、インターロイキン $\gamma$ をコードする遺伝子、
- 膜レセプター、例えば病原生物 (ウイルス、細菌または寄生虫)、好ましくはHIVウイルス (ヒト免疫不全ウイルス) により認識されるレセプターをコードする遺伝子、
- 凝固因子、例えば因子IIIおよび因子IIをコードする遺伝子、
- ジストロフィン $\gamma$ をコードする遺伝子、
- インスリン $\gamma$ をコードする遺伝子、
- 細胞イオンチャンネルに直接または間接的に関与するタンパク質、例えばCFTR (囊性繊維症経膜伝達レギュレーター) タンパク質をコードする遺伝子、
- 病原生物のゲノムに存在する病原遺伝子によるかまたは発現が調節解除される細胞遺伝子、例えば癌遺伝子によ

り生産されるタンパク質の活性を阻害できるアンチセンスRNAまたはタンパク質をコードする遺伝子、

- 酵素活性を阻害するタンパク質、例えば $\alpha$ 1-アンチトリプシンまたはウイルスプロテアーゼ阻害物質をコードする遺伝子、

- 生物学的機能を増強するように変異させた病原タンパク質の変異体、例えば偽的配列に結合する上で天然タンパク質と競合して、それによりHIVの活性化を防げる、例えばHIVウイルスのTATタンパク質のトランス活性変異体をコードする遺伝子、

- 宿主細胞免疫を増加させるために抗原性エピトープをコードする遺伝子、

- 主要組織適合性複合体クラスIおよびIIタンパク質をコードする遺伝子と、これら遺伝子のインデューサーであるタンパク質をコードする遺伝子、

- 細胞酵素または病原生物により生産されるものをコードする遺伝子、および

- 自殺遺伝子。TK-HSV-1自殺遺伝子が特に挙げられる。ウイルスTK酵素は、あるヌクレオシドアナログ (例えば、アシクロビアまたはガンシクロビ) に対して細胞TK酵素と比べ著しく大きな親和性を示す。それはそれらをリン酸分子に変換する、これは毒性であるヌクレオチド前駆体にそれ自体が細胞酵素により変換される。これらのヌクレオシドアナログは合成中



のDNA分子、ひいては主に複製状態にある細胞のDNA中に組み込むことができる。この組み込みにより分岐細胞、例えば癌細胞を特に破壊することができる。

上記リストは限定的なものではなく、他の対象遺伝子も本発明に関して用いてよい。

更に、本発明のもう1つの態様によると、本発明によるアデノウイルスベクターは、非アデノウイルス転写をトランス活性化するタンパク質をコードする非治癒遺伝子を更に含むことができる。当然ながら、トランス活性化タンパク質をコードするE1A領域の遺伝子、その発現はアデノウイルスを非欠陥にするリスクを生じ、は避けられる。Sarkanyian et al. 1989, *Cell* タンパク質をコードする遺伝子が選択されることが好ましい。その発現により、ベクターを補足系、例えば下記で増殖させることができる。このような系により洗練させて、アデノウイルス補足系タンパク質の選択による起こりうる毒性の問題を軽減することができる。転写をトランス活性化するタンパク質をコードする遺伝子は、必要であれば、その発現に適した要素、例えば対象遺伝子を発現させる要素のコントロール下においてもよい。

本発明は、アデノウイルス粒子に加えて、本発明によるアデノウイルスベクターを含んだ真核宿主細胞にも関する。上記細胞は有利には哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞であり、ゲノム中に組み込み形で、または好ましく

は非組み込み(エキソソーム)形で上記ベクターを含むことができる。

本発明によるアデノウイルス粒子は、本発明によるアデノウイルスベクターに欠陥がある機能をイントランスで付与するいずれかの補足系、例えば従来の系293、で選択により生産してもよい。これらの生産技術は当業者に知られている(Graham and Prevec, 1981, *Methods in Molecular Biology*, vol. 7, 119-124, Ed. J. Murray, The Science Press Inc.). 場合により、本発明によるアデノウイルス粒子は、下記のような本発明による補足系で作製してもよい。

よって、本発明は、特に5' 1TRを除くアデノウイルスのゲノムのE1領域の部分を含む補足要素を含んだ補足系にも関し、上記補足要素は欠陥アデノウイルスベクターをイントランスで補い、上記補足系のゲノムに組み込むまたは発現ベクター中に挿入することができる。

本発明に関して、“補足系”という用語は、アデノウイルスベクターに欠陥がある機能をイントランスで付与しうる真核細胞に関する。換言すれば、それは上記アデノウイルスベクターの複製および包膜に必要なタンパク質、それ自ら生産できないウイルス粒子を作る上で要求される初期および/または後期タンパク質を生産することができる。当然ながら、上記部分はヌクレオチドの要素、欠失および/または付加により修飾してもよいが、

但しこれらの修飾は補足性に関してその能力を損うものではない。このため、E1機能に欠陥があるアデノウイルスベクターは(ベクターが生産できないE1領域によりコードされるタンパク質または一連のタンパク質をイントランスで供給できる)E1用の補足系で増殖されなければならない。E1およびE4機能に欠陥があるベクターは(E1およびE4領域によりコードされる必要タンパク質を供給する)E1およびE4用の補足系で増殖され、最後にE1、E2およびE4機能に欠陥があるベクターはその3機能用の補足系で増殖される。要するに挙げられたE3領域は非必須であり、特に補足される必要はない。

本発明による補足系は、無制限に分類しうる不活化細胞系または一次系から誘導される。本発明により追求される目的によると、本発明による補足系はいずれかの欠陥アデノウイルスベクター、特に本発明による欠陥アデノウイルスベクターの包膜に有用である。このため、“欠陥アデノウイルスベクター”という用語は以下で用いられるとき、それは従来または本発明いずれかの欠陥ベクターに関するものと理解されるべきである。

“補足要素”は、本発明に関して使用上アデノウイルスゲノムの部分を少くとも含んだ核酸を意味すると理解される。それは例えばプラスミドまたはウイルスタイプのベクター、例えばレトロウイルスまたはアデノウイルス

ベクター、あるいはポックスウイルスに由来するものに挿入することができる。それでも、それが本発明による補足系のゲノムに組み込まれている場合が好ましい。ベクターまたは核酸を細胞系中に導入して、できればそれを細胞のゲノムに組み込む方法は、このような目的に使用できるベクターのように、当業者に周知の慣用的技術である。補足要素は本発明による補足系中に予めまたは欠陥アデノウイルスベクターに伴い導入することができる。

特別の態様によると、本発明による補足系はE1機能に関して欠陥アデノウイルスベクターをイントランスで補うように考えられる。このような系は組織換えのリスクを減少させるという利点を有しているが、その理由は従来の系293と異なりベクター中に存在する5' 1TRを欠いているからである。

本発明に関して、本発明による補足系はアデノウイルスのゲノムのE1A領域の全部または一部と、

(i) E1B、E2およびE4領域から選択されるアデノウイルスのゲノムのうち少くとも1領域の全部または一部、または

(ii) 上記ゲノムのE1B、E2およびE4領域のうち少くとも2領域の全部または一部、または

(iii) 上記ゲノムのE1B、E2およびE4領域の全部または一部を含むことができる。

本発明に関して、上記領域はそれらを発現させる適切な要素のコントロール下に必要であればよいが、E1A領域によりコードされる転写をトランス活性化するタンパク質により誘導するそれら自体のプロモーターのコントロール下でそれらをおくことが好ましい。

例示として、E1A、E1BおよびE4領域を含んだ例(11)による補足系は、E1およびE4領域に欠陥がある対応領域の全部または一部が欠失されたアデノウィルスの生産に向けられる。

有利な態様によると、本発明による補足系は、特にE1A領域の全部または一部と、E1B領域の初期タンパク質をコードする配列の全体を含んでいる。

更に、この態様の例によると、本発明による補足系は、E1A領域のプロモーター領域を更に欠くことができる。この場合に、上記E1A領域の初期タンパク質をコードするアデノウィルスのゲノムの部分は、上記補足系で構成する適切な真価プロモーターのコントロール下におかれる。それはいずれの真価またはウィルス遺伝子からも導出することができる。しかしながら、初期領域のアデノウィルスプロモーターの使用は避けられる。該誘導するプロモーターは構成プロモーターである。例として、SV40ウィルス、TK-HSV-1遺伝子およびネズミPEGK遺伝子プロモーターも挙げられる。

一方、選択されるプロモーターは、非アデノウィルス

転写をトランス活性化するタンパク質により調節および有利には誘導する。それは天然誘導性遺伝子から導出されたプロモーターであっても、あるいは上記トランス活性化タンパク質に適合する活性化配列(または上述活性化配列を産するUAS)の付加により導出されたいずれのプロモーターであってもよい。更に具体的には、Saccharomyces cerevisiae Gal1 タンパク質により誘導されるプロモーター、好ましくは何らかの種類の遺伝子(例えば、TK-HSV-1遺伝子またはAd2 MLP)の転写開始配列(TATAボックスおよび開始部位)のみを含むいわゆる“最小”プロモーターからなるハイブリッドプロモーターを用いることが好ましく、その上流にはSaccharomyces cerevisiae Gal11遺伝子のくとも1つの活性化配列が挿入される(Walsh et al., J Biol Chem, 257, 1159-1171)。後者の配列は化学的に合成しても、または遺伝子工学の標準技術に従いGal11遺伝子から導出してよい。こうしてハイブリッドプロモーターは活性化され、Gal14タンパク質の存在下のみで、そのコントロール下におかれたE1A領域によりコードされる遺伝子の発現を誘導する。次いでE1A領域の発現産物は、本発明による補足系の場合により含まれる他のE1B、E2および/またはE4初期領域の発現を誘導することができるようになる。本発明のこの具体例は、補足性に必要なアデノウィルスタンパク質の

構成的生産(おそらく、毒性)を回避する。このため、誘導はGal14タンパク質を発現する本発明による欠陥アデノウィルスベクターの存在下で誘導される。しかしながら、このような系はイントランズでGal14タンパク質を供給する条件でいずれかの欠陥アデノウィルスベクターを生産するために用いてもよい。イントランズでタンパク質を供給する手段は当業者に知られている。

一般的に、補足系は動物アデノウィルスから有利に誘導されるアデノウィルス、例えばヒトまたはヒトアデノウィルス、あるいは好ましくはヒトアデノウィルス、最も好ましくはタイプ2または5のゲノムの部分を含んでいる。

本発明による補足系は、

(1) 参照番号H13164としてGenbankデータバンクで開示されている配列のヌクレオチド100~ヌクレオチド5297、または

(11)ヌクレオチド100~ヌクレオチド4034、または

(111)ヌクレオチド505~ヌクレオチド4034にわたるヒトアデノウィルスタイプ5のゲノムの部分を含んでいる。

有利には、(11)によるゲノムの部分は転写終結シグナル、例えばSV40(シミアンウィルス40)またはウサギβ-グロビン遺伝子のポリアデニル化シグナルの上

流に挿入される。一方、E1A領域のプロモーター配列もE1B領域の転写終結シグナルも含まない(111)の部分は、適切なプロモーター、特にGal14タンパク質により誘導するプロモーターと、転写終結シグナル、例えばウサギβ-グロビン遺伝子とのコントロール下におかれる。このような補足系は特に安全であると考えられ、その理由はそれが欠陥アデノウィルスと共通した配列の大部分を欠いているからである。

更に、本発明による補足系は、参照番号H13164としてGenbankデータバンクで開示されている配列のヌクレオチド32800から始まりヌクレオチド35826で終わるヒトアデノウィルスタイプ5のE4領域の部分を含むことができる。

更に、本発明による補足系は、包膜化領域と、5'および3' ITRと、そして最も好ましくは参照番号H13164としてGenbankデータバンクで開示されている配列のヌクレオチド505から始まりヌクレオチド35826で終わるヒトアデノウィルスタイプ5のゲノムの部分を除いて、天然アデノウィルスのゲノムの全体を含むことができる。本発明の目的から、この部分は適切なプロモーターのコントロール下におかれる。Saccharomyces cerevisiae Gal1 タンパク質により誘導されるプロモーターを用いるのが好ましい。このような系によれば、E1、E2およびE4機能に欠陥があるアデノウィルス

ベクター、特に本発明による最小アデノウイルスベクターの複製および包膜化に必要な機能のすべてをイントランスで持てることである。

好ましい形態によると、本発明による補足系は、それを含む細胞を抽出および処理できる選択マーカーをコードする遺伝子を更に含んだ補足要素を含むことができる。本発明に関して、これは選択マーカーをコードするいずれの遺伝子であってもよく、このような遺伝子、有利には抗生物質耐性に関する遺伝子、好ましくはプロマイシン耐性を付与するプロマイシンアセチルトランスフェラーゼ (pac 遺伝子) をコードする遺伝子は通常当業者知られている。

本発明に関して、選択マーカーをコードする遺伝子は、その発現を行う適切な要素のコントロール下においてもよい。これらには構成プロモーター、例えば SV40 ウイルス初期プロモーターがある。しかしながら、E1A 領域によりコードされるトランス活性化タンパク質で誘導されるプロモーター、特に E2A アデノウイルスプロモーターが好ましい。このような組合せは、本発明による補足系で E1A 領域の遺伝子の発現を維持するための選択の圧力を誘導する。本発明の目的から、選択されるプロモーターはマクロファージの欠失、変異、置換および/または付加により誘導されていてもよい。

最も好ましい形態によると、本発明による補足系は原

系を用いる。

本発明の主題は、本発明によるアデノウイルスベクター、アデノウイルス粒子、真核宿主細胞または補足系の治療または予防のための使用に関する。

最後に、本発明は、薬学的観点から許容されるピヒクルとともに、本発明によるアデノウイルスベクター、アデノウイルス粒子、真核細胞または相補細胞を治療または予防剤として含んでなる、医薬組成物に関する。

本発明による組成物は、疾患、例えば

- 遺伝障害、例えば血友病、難治性難産またはデュシェンヌおよびベッカータイプ筋萎縮、
- 癌、例えば癌遺伝子またはウイルスにより誘導される癌、
- レトロウイルス疾患、例えばエイズ (HIV 感染に起因する後天性免疫不全症候群)、および
- 再発ウイルス疾患、例えばヘルペスウイルス誘導感染の予防または治療として特に考えられている。

本発明による医薬組成物は常法で製造される。特に、治療有効量の治療または予防剤が、ピヒクル、例えば希釈剤と組み合わされる。本発明による組成物はエゾールに組み入り、あるいは当業界で使用上慣用的ないずれかの経路、特に経口、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内、脚内または気管内経路により投与される。投与は1回分の用量で、またはある時間間隔後に1回以上繰返される用量

学的観点から許容される経路系から誘導される。"薬学的観点から許容される経路系"は、特許付けられて(その起源および由来が知られている)および/または上ト用の原料の大規模生産(高度臨床試験用パッケージまたは販売用パッケージのアセンブリー)に底に用いられた細胞系を意味すると理解されている。このような系は A T C C のような組織から入手できる。この点においては、F835 アフリカミドリザル腎臓、BHK21 グルゲンまたは J772 ハムスター腎臓系、肺腫瘍由来する A549 ヒト系と、MRC5 ヒト胎、W138 ヒト胎および CHO チャーニー-ハムスター肺臓系が挙げられる。

一方、本発明による補足系は一次細胞、特にヒト胚から採取される間葉細胞から誘導することができる。

本発明は本発明によるアデノウイルス粒子の生産方法にも関し、それによれば

本発明によるアデノウイルスベクターが、トランスフェクトされた補足系を得るために、上記ベクターをイントランスで補える補足系中に導入され、

- 上記補足系が上記アデノウイルス粒子の生産を行うために適した条件に従い培養され、および
- 上記粒子が細胞培養で回収される。

当然ながら、アデノウイルス粒子は培養上澄から、但し使用のプロトコルにより細胞からも回収される。

好ましくは、本発明による方法では本発明による補足

で行う。適切な投与経路および投与量は様々なパラメーター、例えば治療される個体または治療される障害、あるいは導入される対象遺伝子に応じて変わる。一般的に言えば、本発明による医薬組成物は  $10^4 \sim 10^{14}$ 、有利には  $10^5 \sim 10^{11}$ 、好ましくは  $10^6 \sim 10^{11}$  の本発明によるアデノウイルスの投与量を含む。医薬組成物、特に予防目的に用いられるものは、薬学的観点から許容されるアジュバントを更に含むことができる。

本発明は、本発明によるアデノウイルスベクター、アデノウイルス粒子、真核細胞または補足系の治療有効量がこのような治療を受ける患者に投与される治療方法も含んでいる。

本発明は下記図面を参照して下記例により詳細に記載されている。

図1は、異なる遺伝子の位置を示した、ヒトアデノウイルスタイプ5のゲノムの(0-100の任意単位で表される)略図である。

図2はベクター-pTG16546の略図である。

図3はベクター-pTG16581の略図である。

図4はベクター-pTG16303の略図である。

図5はベクター-pTG1660およびpTG1661の略図である。

図6はベクター-pTG1653、pTG1654およびpTG1655の略図である。

- 図7はベクター-pTG5913の略図である。  
 図8はベクター-pTG18512の略図である。  
 図9はベクター-pTG8513の略図である。  
 図10はベクター-pTG8514の略図である。  
 図11はベクター-pTG8515の略図である。

図

下記例は本発明の一形態のみを示している。

下記例は、Basaltin et al. (1993, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) で評述された遺伝子工学および分子クローニングの一般的な技術に従い行う。細菌プラスミドを用いるクローニングの選択工程は Escherichia coli (E. coli) 株 5'K または B12 で種代により行なわれ、一方ファージ M13 から誘導されたベクターを用いる場合は E. coli NM522 で種代により行なわれ、PCR 増幅の工程に関しては、PCR Protocols: A guide to methods and applications (1990, edited by White, Gelfand, Saiki and White, Academic Press Inc.) で記載されたプロトコルが適用される。

更に、細胞は当業者に周知の標準技術に従いトランスフェクトする。リン酸カルシウム技術 (Basaltin et al., 1993) も挙げられる。しかしながら、細胞を細胞内に導入させる他のプロトコル、例えば DEAE デキストラン技術、エレクトロポレーション、浸透圧ショック

に基づく方法、選択細胞のマイクロインジェクションまたはリポソームの使用に基づく方法も用いてよい。

下記の異なる複製体に挿入された断片は、

- 参照番号 871100 として Genbank データバンクで開示されている Ad5 ゲノム、
  - 参照番号 711115 として Genbank データバンクで開示されている アデノウイルス タイプ 2 (Ad2) ゲノム、
  - 参照番号 102100 として Genbank データバンクで開示されている SV40 ウイルスゲノム
- のヌクレオチド配列でそれらの位置に従い正確に示されている。

#### 例1: 包膜化領域の部分の欠失を含んだ「弱毒化」アデノウイルスの作成

##### 1. 包膜化領域のヌクレオチド184~ヌクレオチド273の欠失を含んだ「弱毒化」ベクターの組立て

以下を含んだベクター:

- Ad5 ゲノムの 5' ITR (ヌクレオチド1~ヌクレオチド103)、
- ヌクレオチド184~ヌクレオチド273にわたる部分が欠失されて、176位のチミン (T) が AattII 制限部位を作るためにシトシン (C) に変えられた、ヌクレオチド104~458にある Ad5 包膜化領域、
- 5' から 3' にかけて Ad2 MLP (ヌクレオチド5779~6038)、KpnI-XbaI

HindIII および BamHI 制限部位、CFTR タンパク質をコードするヒト cDNA (Bardot et al., 1993, Science, 265, 1066-1071) で公表された配列に相当するアミノ酸組成; 但し 470 位はメチオニンの代わりにバリン)、PstI, XbaI および SalI 部位と、最後に SV40 ウイルス転写終結シグナル (ヌクレオチド2665~2538) を含んでなる、対象遺伝子の発現用カセット、および

- ヌクレオチド3329~ヌクレオチド6241にわたる Ad5 ゲノムの断片を組み立てる。

第一段階では、pMLP11 から単離された EcoRI-SmaI 断片をベクター M13TG131 (Eller et al., 1993, Gene, 161, 91-93) の EcoRI および EcoRV 部位間に組み込んでクローニングする。この組立ては pMLP10 (Gardner et al., 1991, Gene, 101, 193-193) から始めるが、HindIII 部位における SmaI 部位の導入により親ベクターとは異なる。ベクター M13TG6501 を得る。後者は、包膜化領域のヌクレオチド184~273 間にある配列を欠失させるために、特定部位変異研究に付す。特定部位変異研究では供給業者の助に依り市販キット (Amersham) を用いて行い、配列確認池1 (配列番号1) で示されたオリゴヌクレオチド OTG4.174 を用いる。変異ベクターを

M13TG6502 と命名した。こうして欠失された包膜化領域は EcoRI および SmaI で切断されたベクター pMLP11 中に EcoRI-BglII 断片の形で再導入するが、その BglII 部位はクレノウ DNA ポリメラーゼ処理で平滑化されている。

得られたベクター-pTG6500 を PstI で部分的に切断し、ファージ T4 DNA ポリメラーゼで処理し、その後 PvuI で切断する。(pMLP11 から誘導された) pTG5955 から単離された PvuI-HpaI 断片をこのベクター中に挿入する。この断片は SV40 ウイルス転写終結シグナルとヌクレオチド3329~ヌクレオチド6241にわたる Ad5 ゲノムの部分を含んでいる。こうして形成されたベクター-pTG6505 を SphI で部分的に切断し、ファージ T4 DNA ポリメラーゼで処理し、再結合させるが、この目的はポリリンカーの 5' 末端に位置する SphI 部位を壊すことである。これにより pTG6511 を得て、その中に、BamHI 切断およびクレノウ DNA ポリメラーゼ処理後に、ヒト CFTR cDNA を XhoI-AvaI 切断およびクレノウ DNA ポリメラーゼ処理により形成された平滑末端断片の形で組み込んでクローニングする。pTG6525 を得る。指標として、CFTR cDNA は従来のプラスミド、例えば pTG5960 (Gallagher et al., 1991, Science, 254, 526-528) から単離

する。

## 2. 包膜化領域のヌクレオチド270～ヌクレオチド346の欠失を含んだ「弱毒化」ベクターの組立て

ベクター-M13TG6501を、オリゴヌクレオチドOTG4173 (配列番号2) を用いる特定部位変異誘発に付す。次いで変異断片を前記のようにpMLP11中に再導入して、ベクター-pTG6501を得る。後者をSphIで切断し、ファージT4 DNAポリメラーゼ、その後PvuIIで処理する。pTG6546 (図2) は、pTG6525から単離されたPvuI-KpnI断片 (KpnI部位は平滑化されている) をクローニングして、ヒトCFTR cDNAを含有させることにより得る。

## 3. 包膜化領域のヌクレオチド287～ヌクレオチド358の欠失を含んだ「弱毒化」ベクターの組立て

ベクター-M13TG6501を、包膜化領域のヌクレオチド287～358間にある配列を欠失させるために特定部位変異誘発に付し、NcoI部位を導入するために275および276位のチミンをグアニンに変えて、NcoI部位を導入する。変異誘発はオリゴヌクレオチドOTG4191 (配列番号3) を用いて行い、M13TG6507を得る。後者をBgIIIで開裂させ、クレンジDNAポリメラーゼで処理し、その後EcoRIで切断し、対応変異断片を精製し、EcoRIおよび

SmaIで切断されたpMLP11中に導入する。

pTG6504を得て、それからSphI (ファージT4 DNAポリメラーゼ処理で平滑化された部位)・PvuII断片を単離し、pTG6511のKpnI部位 (T4ポリメラーゼ処理で平滑化) とPvuI部位との間に挿入する。pTG6513を得て、これをBamHIおよびクレンジDNAポリメラーゼで処理してから、pTG5960のAvaIおよびXbaI断片を挿入して、pTG6526を得る。

## 4. 欠陥および包膜化領域欠陥アデノウイルスの作製

欠陥組換えアデノウイルスは、相同的組換えで組換えウイルスを得るために、CIa'およびAd-d1324ゲノムDNA (Thompson et al., 1991, Cell, 61, 151-1511) で直感化されて更にCIa'で切断されたpTG6525、pTG6526またはpTG6546の293細胞中へのコトランスフェクションにより作製する。8～10日後、個々のプラークを単離し、293細胞で増殖させ、制限地図作製により分析する。ウイルスストック (AdTG6525、AdTG6526およびAdTG6546) を集め、それらの力価を慣用的技術に従い調べる。

AdTG6546ウイルスは、野生型包膜化領域を含むAd-CFTR (Barnes et al., 1991, Cell, 61, 151-1511) の同時感染により、融合状況下におく。293

細胞を細胞当たり5 pla (プラーク形成単位) のAd-CFTRおよび5 plaのAdTG6546で感染させる。進行して、全ウイルスDNAをBstIで消化 (Barnes et al., 1991, J. Virol., 65, 91-103) により単離し、包膜化ウイルスDNAを0.1%デオキシコロール酸とその後10 μg/mlのデオキシリボヌクレアゼ (DNアーゼ) Iで細胞を処理した後に単離して、ビオンで保護されていないDNAを除去する。全Ad-CFTRおよびAdTG6546 DNAの量は同一であるが、包膜化AdTG6546 DNAの約3倍の包膜化Ad-CFTR DNAがある。

AdTG6546感染293細胞の細胞抽出物におけるCFTRタンパク質の発現のレベルを測定する。分析はBarnes et al. (1991, Nature, suppl.) に記載された技術に従いウエスタンブロッティングによりモノクローナル抗体MATG1031を用いて行う。しかしながら、CFTRタンパク質の抗原性エピトープを認識するいくつかの抗体も用いてよい。約170 kDaの予想分子量の産物を検出する。指針として、生産のレベルは未弱毒化Ad-CFTRウイルスで感染された細胞抽出物で得られる場合におおよそ等しい。

## 例2: E1A領域とE1B領域の初期タンパク質をコードする配列の全体が欠失された欠陥アデノウイルスの作製

### 1. CFTRタンパク質発現用の組換えアデノウイルス (AdTG6581) の生産

このようなアデノウイルスは、5'から3'にかけてAd5 5' ITR (ヌクレオチド1～103)、Ad5包膜化領域 (ヌクレオチド104～458)、下記要素を含んだ発現カセットを含む外膜ヌクレオチドF:

- Ad2 MLP (ヌクレオチド5779～6038)、その後Ad2の3つの三分リダー (ヌクレオチド6039～6079; ヌクレオチド7101～7175; ヌクレオチド79637～97122); これらのリダーは下流に挿入された配列の翻訳の効率を増加させるために含まれる。

- 対象遺伝子のクローニングに使用しうるXbaI、HindIII、BamHI、EcoRV、HpaIおよびNotI制限部位を5'から3'にかけて含んだポリリンカー。

- 対象遺伝子、例えばCFTRタンパク質をコードする遺伝子。

- SV40ウイルスから単離された転写終結シグナル (ヌクレオチド2543～2618)。

・マクレオチド4047~6241にわたるAd5アデノウイルスゲノムの部分を含んだプラスミドベクター-pTG6581から作製する。

マクレオチド4047・マクレオチド4614にわたるAd5ゲノムの断片をAd5ガリムDNAからPCRにより増幅させる。PCR反応では、後のクローニング工程を容易にするためにBamHI部位を5'末端に含むセンスプライマー-OTG5121(配列番号4)とアンチセンスプライマー-OTG5157(配列番号5)を用いる。こうして形成された断片をクレンジング用酵素で処理してから、M13mp18(Gibco BRL)のSmaI部位中に組み込んでクローニングして、M13TG6517を得る。PCRで形成された断片の配列は、標準方法(Seeger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5461)に従い確認する。

別に、PvuI-SmaI断片をpMLP1から準備する。それをpTG6511(例1.1)のPvuIと-pnI部位間に組み込んでクローニングするが、KpnI部位は標準方法に従いファージDNAポリメラーゼ処理で平滑化されている。ベクター-pTG6517にこうして形成する。

後者を酵素SalIおよびBstXIで切断し、2つの断片に結合させるが、一方はM13TG6517の模

型BamHI-BstXI断片で、他方はpTG6185のXhoI-BglII断片である。後者はXhoIおよびBglII制限部位に隣接するSV40ウイルス転写終止シグナルを特に含んでいる。しかしながら、同様の終止配列と適切な制限部位を含んだいずれかのプラスミドも使用できる。ベクター-pTG6555を得るが、その中に、2つの制限部位形成平末端EcoRVおよびHpaIを含むアダプターを唯一のBamHI部位に挿入する。このアダプターはオリゴマクレオチドOTG5564およびOTG5565(配列番号1および1')の組換えから形成する。pTG6580を得る。最後に、末端が平滑化されてヒトCFTR cDNAを含むpTG6525のSacI-PstI断片を、pTG6580のEcoRV部位中に組み込んでクローニングする。pTG6581(図3)を得る。

対応組換えアデノウイルスAdTG6581は、標準プロトコールに従い、E1機能用の補足系、例えば系293または例6の系中への、双方ともC1a1で調製されたpTG6581およびAd1324のコトランスフェクションにより得る。

2. IFN- $\gamma$ 発現用の組換えアデノウイルスの生産  
ベクター-pTG6303(図4)を、M13TG2437のHpaI-SmaI断片をpTG6580のHpaI部位中に組み込んでクローニングすることによ

り得る。上記断片は、配列がGray et al. (1991, Nature, 351, 511-513)で特定されているインターフェロン(IFN- $\gamma$ )をコードする遺伝子をベクターM13TG130(Klier et al., 1991, supra)に組み込んでクローニングすることにより得る。組換えアデノウイルスAdTG6303は、標準技術に従い、E1機能に関する補足系中へのC1a1で直線化されたpTG6303およびAd1324のコトランスフェクションに基づき同様の組換えにより得る。

### 3. E3領域が欠失されてE3領域が構成プロモーターのコントロール下におかれているアデノウイルスの作製

ベクター-pTG1670は、ベクター-pポリII(Klier et al., 1991, supra, 51, 191-193)のAatII-BamHI部位間にRSVウイルス(ラウス肉腫ウイルス)3'LTR(長末端反復)を含むPCR断片をクローニングすることにより得る。PCR反応では、鋳型としてベクター-pRSV/L(Da Veit et al., 1987, Mol. Cell. Biol., 7, 125-131)と、プライマー-OTG5892およびOTG5893(配列番号8および9)を用いる。

別に、E3領域の5'部分(マクレオチド27588~28607)は、ベクター-pTG1659からプライマー-OTG5920およびOTG5891(配列番号10および11)を用いたPCRにより増幅させる。後者のベクターは数工程で組み立てる。BamHI-AvrII断

片(マクレオチド21562~28752)をAd5ゲノムDNAから得て、その後pTG7457の同部位間に組み込んでクローニングして、pTG1649を得る。ベクター-pTG7457は、特にAvrII部位を含むようにポリリンカー中で修飾されたpUC19(Gibco BRL)である。次いでM13TG1646(例8)のEcoRI(クレノウ)-AvrII断片をAvrII-NdeI(クレノウ)で調製されたpTG1649中に導入して、ベクター-pTG1651を得る。最後に、pTG1659を、AvrIIで直線化されたpTG1651中にAd5ゲノムDNAの複製型AvrII断片(マクレオチド28752~35463)を挿入することにより得る。PCR断片をpポリIIのXbaI-BamHI部位間に組み込んで、pTG1671を得る。次いでpTG1670から得られたEcoRV-AatII断片をpTG1671のAatII部位に挿入して、pTG1676を得る。

マクレオチド27331~30049に相当するAd5のEcoRI断片をゲノムDNA調製物から単離し、EcoRIで既に開裂されたpBluescript-5k+(Stratagene)中に組み込んでサブクローニングする。pTG1669を得る。後者は27867位(真実原性オリゴマクレオチドOTG6079; 配列番号12)または28249位(真実原性オリゴマクレオチドOTG6

080 : (配列番号11) で B<sup>am</sup>HI 部位を導入することにより変異させる (Aarishita 111)。pTG1672 および pTG16733 を各々得る。RSV 3'LTR に続いて E3 領域の 5' 部分を含む B<sup>am</sup>HI - B<sup>st</sup>II 部位をベクター-pTG1676 から単離し、先の工程で得られたベクターの B<sup>am</sup>HI 部位 (27331 または 30049 位) と B<sup>st</sup>II 部位 (28390 位) との間に挿入して、pTG1977 および pTG1978 を得る。次いでこれら 2 つのベクターの各々から得られた E<sup>co</sup>RI 断片を野生型 E<sup>co</sup>RI 断片の代わりとして pTG1679 へと組込む。pTG1679 - E3' を得る。参考のため、ベクター-pTG1679 は pTG6584 (例 3. 1) の B<sup>st</sup>II 部位と B<sup>am</sup>HI 部位 (クレノウポリメラーゼ処理により平滑化された部位) との間に組み込まれた pTG6590 (例 3. 1) の B<sup>st</sup>II - KpnI 断片 (T4 ポリメラーゼ処理により平滑化された部位) のクローニングから得る。

アデノウイルス粒子を、pTG1679 - E3+ の A<sup>st</sup>II 断片とアデノウイルスベクター、例えば Ad d1324 または Ad - RSV $\beta$  - gal との間で E1 遺伝子の補正系における相同的組換えにより作製する。後者は E1 領域の代わりに  $\beta$  - ガラクトシダーゼ遺伝子を含んでいる (Stratford-Reed et al., 1992, J. Clin. Invest., 90, 626-639)。

pOTG5482 (配列番号18および19) による PCR で形成する。次いでこの断片を M13mp18 の SmaI 部位に組み込んでクローニングし、M13TG6519 を得る。次に、ベクター-pTG6584 を XbaI で切断し、その後 E3 領域の対応断片を除去するために再結合させる。pTG6589 を得て、これを B<sup>am</sup>HI で開裂させ、クレノウで処理し、その後 B<sup>st</sup>II で切断する。M13TG6519 の複製 E<sup>co</sup>RI (クレノウ) - B<sup>st</sup>II 断片をこうして処理されたベクター中に導入して、pTG6590 を得る。

参考のため、ベクター-pTG6584 は唯一の SpeI 部位 (27082 位) - E4 領域のプロモーター領域の開始部 (35826 位) にわたる Ad5 配列を含んだ pUC19 ベクター (Gibco BRL) である。それは pTG1659 (例 2. 3) を SalI および SpeI で切断し、クレノウ DNA ポリメラーゼで処理し、その後再結合させることにより得る。

2. E1 領域と g<sub>p19</sub>II タンパク質を発現しない E3 の部分が欠失されたアデノウイルスベクターの組立て

g<sub>p19</sub>II をコードする Ad5 の E3 領域の部分 (ヌクレオチド 28731 - 29217) を、Ad5 ゲノム DNA 調製物からプライマー-OTG5455 および OTG5456 (配列番号18および19) を用いた PCR

例 3 : E1 および E3 領域の部分欠失による改善されたクローニング能力を有した組換えアデノウイルスベクターの組立て

1. pTG6590 $\Delta$ E3 の組立て

ヌクレオチド 27325 - 27871 間にある Ad5 ゲノムの部分を有した断片を、Ad5 ゲノム DNA 調製物からプライマー-OTG6064 およびプライマー-OTG6065 (配列番号18および19) を用いた PCR により増幅させる。OTG6065 はその 5' 末端に B<sup>am</sup>I 部位を含むが、これは E3 領域でも (30750 位) 存在している。

増幅された断片を M13mp18 の SmaI 部位に組み込んでクローニングし、M13TG6523 を得る。E<sup>co</sup>RI - B<sup>am</sup>I 断片を後者から単離し、同酵素で開裂されたベクター-pTG6590 中に導入する。pTG6590 $\Delta$ E3 が得られ、これはアデノウイルスゲノムの 3' 部分 (ヌクレオチド 27082 - 35935) を含んでいるが、その部分からはヌクレオチド 27872 - 30740 間にある E3 領域が欠失され、一方 E3 領域のもっと小さな部分 (28592 - 30470 位) は pTG6590 から欠失されていた。ベクター-pTG6590 は下記のようにして得る。ヌクレオチド 35228 - 35935 にわたる断片 (3' LTR を含む) を Ad5 ゲノム調製物からプライマー-OTG5481 およ

により得る。形成された断片を M13mp18 の SmaI 部位中に導入して、M13TG6520 を得る。後者の E<sup>co</sup>RI - XbaI 断片を単離して、pTG1670 (例 2. 3) の A<sup>st</sup>II 部位に組み込んでクローニングするが、その部位はクレノウ DNA ポリメラーゼ処理で平滑化されている。次いで先の工程のベクターの複製 XbaI 断片をベクター-pTG6590 $\Delta$ E3 (例 3. 1) の XbaI 部位中に導入する。

3. アデノウイルス粒子の生産

組換えウイルス粒子を、AdTG6303 または AdTG6581 ゲノム DNA から単離された SpeI 断片と例 3. 1 および 3. 2 のベクターのどれかとの結合により得る。次いで結合混合物を E1 遺伝子に関する補正系中にトランスフェクトする。

例 4 : E1 および E4 領域が欠失されたアデノウイルスの作製

ヌクレオチド 31803 - 32799 および 35827 - 35935 にわたるアデノウイルスゲノムの部分を、Ad5 ゲノム DNA 調製物からプライマー-OTG5728 および OTG5729 (配列番号20および21) と OTG5730 および OTG5781 (配列番号22および24) を各々用いて増幅させる。約 10 回の増幅サイクル後に、反応はオリゴヌクレオチド OTG5728 および OTG5781 を用いて 2 反応混合物の一部に基づき

脱ける。増幅断片はヌクレオチド31803~35935にわたり、E4領域の全部(32800~35826位)が欠失している。EcoRIおよびHindIII切断後に、それをM13mp18の同部位間に組み込んでクローニングし、M13TG6521を得る。

M13TG6521をEcoRIで切断し、クレンウDNAポリメラーゼで処理し、その後BstXIで開裂する。3'LTRを含んだ0.46kb断片をクレンウDNAポリメラーゼ処理で増幅化されたBamHI部位とpTG6584(例3.1)のBstXI部位との間に挿入する。pTG6587を得て、これをXbaIで切断し、その後それぞれと再結合させ、pTG6588(E3の欠失)を得る。

オリゴヌクレオチドOTG6060、OTG6061、OTG6062およびOTG6063(発列番号11~15)の組換えから得た合成DNA断片をpTG6588のPacI部位中に導入する。これによりpTG8500を得て、その中におけるLS後期遺伝子の転写終結シグナルを改善する。

E4領域の全部(ヌクレオチド32800~35826)とE3領域のXbaI断片(ヌクレオチド28592~30470)が欠失されたゲノムを有するアデノウイルス粒子(AΔE4)を、pTG8500またはpTG6588とAΔ5から単離されたSpeI断片の結

合により形成する。結合混合物をE4細胞に関する相補細胞系、例えば系W162 (Weisberg and Estess, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 5315-5318)中にトランスフェクトする。E1およびE4細胞に欠陥があるアデノウイルス(ΔE1、ΔE4)は、AΔd1324ゲノムとSpeIで線型化されたプラスミドpTG8500またはpTG6588との結合混合物のE1およびE4に関する補足系(例えば、例8の系)中へのトランスフェクションにより得る。

更に、下記のように行うことも可能である。pTG1659(例2.3)から単離されたSpeI-ScaI断片をこれら同様に開裂されたベクターpTG65818中に組み込んでクローニングし、pTG6591を得る。後者はヌクレオチド21062~35935のAΔ5配列を含んでいるが、そこからは上記のようにE4領域の全部とE3領域のXbaI断片が欠失されている。上記の合成DNA断片をPacIで切断されたベクターpTG6591中に導入して、pTG6597を形成する。アデノウイルス粒子は、SpeIで開裂されたAΔd1324ゲノムDNAとBamHIで開裂されたプラスミドpTG6591またはpTG6597との相同的組換えにより得てもよい。

#### 例5: "最小" ウイルスの作製

いわゆる"最小"アデノウイルスベクターは、プラスミド中に下記要素:

- AΔ5 5' ITR (ヌクレオチド1~103)、
- AΔ5包膜化領域(ヌクレオチド104~458)、
- 下記を含む外膜ヌクレオチド配列:
  - 自然発現にできるだけ近い発現の調節を得るために、好ましくは自己のプロモーターの存在下におかれた、治療対象の第一遺伝子、
  - TK-HSV-1遺伝子からなる対象の第二遺伝子、
  - 場合により、包膜化されるゲノムの全サイズが30~36kbであるような包膜化または複製の効率の理由から加えられる、何らかの種類のヌクレオチド配列、
  - 高等真核細胞で機能的なプロモーターのコントロール下におかれたheteromultimeric constitutive cell タンパク質(Laughon and Castellani, 1984, Mol. Cell. Biol., 4, 165-167)をコードする配列、および
  - AΔ5 3' ITR (ヌクレオチド35833~35935)

を組み込んでクローニングすることにより形成する。

これらの異なる要素のアセンブリーは分子生物学の標準技術に従う。このようなベクターを含んだ感染性ビリオンの生産は例7の補足系で上記のように行う。

#### 例6: E1細胞をイントランスで結る相補細胞の形成

##### 1. ヌクレオチド100~5297のE1領域(pTG6533)を含んだ相補細胞の形成

この細胞は以下を含んでいる:

- 遺伝子がSV40ウイルス初期プロモーター(ヌクレオチド5171~5243)のコントロール下におかれて、3'末端にSV40転写終結シグナル(ヌクレオチド2543~2618)を含んだ、pac遺伝子の発現用カセット。用いられたpac遺伝子は、Lucilla et al. (1981, Gene, 75, 375-388)に開示された配列のヌクレオチド252~ヌクレオチド905にわたり、公表配列と比べて4つの変更点(305位でCの代わりにA; 367位でCの代わりにT; 804位でGの挿入; 820位でGの欠失)を含んだ断片に相当する。
- ヌクレオチド100~5297にわたるAΔ5ゲノムの断片。この断片は、自己のプロモーターおよび転写終結シグナルをもったE1AおよびE1B領域と、E2領域のフラクションを含んでおり、このためタンパク質IIをコードする配列と重複している。指針として、系293は機能性タンパク質IIを生産することができないらしい。

組立ては以下で詳述されたいくつかの工程で行う。ベクターpポリIII-1<sup>8</sup> (Lilja et al., 1987, Gene, 57, 193-211)を酵素AccIおよびEcoRIによる切断に



付す。プラスミド pTG6164 から単離された EcoRI - ClaI 断片をこうして処理されたベクター中に組み込んでクローニングする。ベクター pTG6528 を得る。

プラスミド pTG6164 は pLXSN (Miller D, 1983, *Site/Technology*, 1, 188) から調製し、SV40 ウィルス初期プロモーターのコントロール下におかれた pac 遺伝子を含んでいる。簡単に言えば、pLXSN の HindIII-KpnI 断片を M13TG4131 中に導入して、M13TG4194 を得る。pMPSV H2 K 1 L2R (Takahara et al., 1988, *Growth Factors*, 1, 31-44) の NheI-KpnI 断片を後者に挿入し、NheI および KpnI で切断して、M13TG4196 を得る。後者を HindIII-KpnI で切断し、HindIII 切断および部分的 KpnI 切断から得た pLXSN の複製断片をクローニングする。pTG5192 を得る。後者を HindIII と部分的に NheI で切断し、pBic Plasmid (Leach et al., 1988, *Nucleic Acids Res.*, 16, 1511) の HindIII-NheI 断片を導入して、pTG6164 を得る。

ベクター pTG6528 を PstI で切断し、SV40 転写終結シグナルを含んだ pTG6185 (例 2, 1) から単離された PstI 断片をこの部位に導入する。pTG6529 を得る。後者を EcoRI-HpaI 切

断に付し、2断片と結合させるが、一方は Ad5 ゲノム DNA の複製 BspEI-BcgI 断片 (826-5297) 位で、他方は EcoRI および BspEI 末端で PCR により形成された断片であって、pTG6531 を得る。PCR 断片は Ad5 ゲノム DNA とプライマー OTG4564 および OTG4565 (SEQ ID NO: 11 および 12 で記載) からの遺伝子増幅により得る。増幅断片を酵素 EcoRI および BspEI で切断し、先の段落で記載されたように結合させる。

ベクター pTG6531 は両方向に 2 つの転写単位 (E1 領域の単位と pac 遺伝子の単位) を含んでいる。転写で干渉を避けるためには、それらは pTG6531 を BspEI で処理して再結合させることに留意し、互いに逆方向におく。ベクター pTG6533 は 2 単位の逆方向を示すクローニングに相当する。

ベクター pTG6533 をリン酸カルシウム技術により哺乳動物細胞系、例えば F9 (ATCC, CCL81) または A549 (ATCC, CCL185) 系中にトランスフェクトする。トランスフェクトされた細胞を供給業者の勧めに従い培養し、プロマイジン (濃度  $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 含有選択培地にトランスフェクション後 24 時間おき、陽性クローンを選択し、そこでは E1 領域の遺伝子の発現について最も生産的なクローニングを調べるために評価するが、これは E1 領域に欠陥があるアデノウイルス、例えば例 2 で詳述されたも

の生産用の補足系として用いてよい。

E1 領域の初期タンパク質をコードする配列の発現は、アイソトープ  $^{32}\text{P}$  で標識された適切なプロブを用いて、ノーザンブロットングにより分析する。

E1A 領域でコードされたタンパク質の生産は、細胞をアイソトープ  $^{35}\text{S}$  で標識した後に市販抗体 (Oncogene Science Inc., reference D911) を用いた免疫沈降により検出する。

(E1B mRNA のノーザンブロット分析により) E1B 領域のプロモーターを活性化するか、または (E2 プロモーターのコントロール下におかれた CAT (クロロムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) を含む "リポーター" プラスミドの一時トランスフェクション後に酵素活性を調べることに) E2 領域のプロモーターを活性化するか、E1A 領域の発現産物の能力を確認することもできる。

最後に、これらの細胞を Ad-RSV- $\beta$ gal (Stratford-Reed et al., 1992, *report*) で感染させて、細胞反応性効果が観察されるとすぐに感染技術でウイルスを測定することができ、一般的に、検出は下記のとおりである。細胞を 10 の  $\text{moi}$  (感染多重度) で感染させる。感染の約 48 時間後、細胞反応性効果があらわれたときに、細胞を溶解させて、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を慣用的プロトコルに従い調べる (例えば、Mettlitz

et al., 1993, *report* 参照)。陽性クローンをもっと低い  $\text{moi}$  で再感染させる。感染の約 48 時間後に、上述および細胞を標準技術に従い養育する。ウイルス力価は 293 細胞を用いて凍天液法により決める。得られた力価が初期力価の比率が増幅ファクターになる。

2. ヌクレオチド 505-4034 の E1 領域を含んだ補足系 (pTG6557、pTG6558、pTG6559、pTG6564 および pTG6565) の組立て

ベクター pTG6557、pTG6558 および pTG6559 は以下を含んでいる：

- (1) 以下のコントロール下にある pac 遺伝子 (前記のようなヌクレオチド 252-905) の発現用カセット：  
Ad2 E2A プロモーター (ヌクレオチド 27341-27030) (pTG6558 の場合)。  
ヌクレオチド 27163-27182 間にある配列が欠失された Ad2 E2A プロモーター (pTG6557 の場合)。このような変異から、E1A でコードされたトランス活性化タンパク質による調節に影響を与えることなく、E2A プロモーターの基準レベルを減少させることができる。または、

pTG6559 の場合 SV40 初期プロモーター  
上記 3 つの場合において、それは 3' 末端に SV40 ウィルス転写終結シグナル (ヌクレオチド 2543-2618) も含んでいる；および

(11)タクロチド505-4034にわたるAd5 E1領域の部分を含んだ発現カセット。アデノウイルスゲノムのこの部分は、E1A領域の初期タンパク質をコードする配列の全部、E1A領域の転写終結シグナル、E1Bプロモーター（E1Aでコードされるトランス活性化タンパク質により誘導される）、E1B領域のコード配列の全部を含んでいる。それはタンパク質IIをコードする配列も含んでおり、E1B領域と重複している。しかしながら、それはE1A領域のプロモーターとE1BおよびII転写単位の転写終結シグナルを欠く。E1B領域の配列を発現させるためには、ネズミPGK遺伝子プロモーターをアデノウイルス断片の5'末端に導入し、ウサギβ-グロビン遺伝子の転写終結シグナル (Guthrieデータバンクで参照番号111154として開示されている配列のタクロチド1542-2064)を3'末端に導入する。

場合により、何らかの種類の、例えばpBR322 (Bolivar et al., 1977, Gene, 1, 13-131)、から単離されたタクロチド配列も、転写で生じる干渉を避けるために、pαc遺伝子とE1領域との発現用カセット間に導入してよい。

これらベクターの組立ては下記いくつかの工程で行う。

最初に、タクロチド505-タクロチド826に

β-グロビン遺伝子の転写終結シグナルを含んだこの断片を、ベクターpポリ1-511/Not-14 (Liska et al., 1987, Gene, 57, 131-139) のSma IおよびBam HI部位間に導入する。得られたベクターpTG6551は、タクロチド3665-タクロチド4034にわたるAd5ゲノムの断片をその中に導入するために、酵素Sph IおよびEco RVでその一部について切断する。この断片は標準プロトコルに従いPCRで形成する。用いられた操作は、隣接してAd5ゲノムDNA複製物と、3665位で内部Sph I部位と重複するプライマー-OTG5015 (配列番号11) および5'末端にBg III部位を含むOTG5014 (配列番号31)を用いる。

PCR断片をクレンジグDNAポリメラーゼで処理してから、M13mp18のSma I部位中に組み込んでクローニングし、M13TG6516を得る。その配列の確認後、PCR断片をBg III切断、クレンジグDNAポリメラーゼ処理およびSph I切断により抽出する。それをpTG6551のSph IおよびEco RV部位間に導入する。これによりpTG6554を得る。

次に、ベクターpTG6529 (例6, 1)を酵素Hpa IおよびHind III切断に付す。pαc遺伝子とその後にSV40ウィルス転写終結シグナルを含んだ2,913断片を複製する。この断片を、Ad2 E2A

にわたるAd5ゲノムの部分は、ゲノム複製物から、後のクローニング工程に有用なpE1部位を5'末端に含むプライマー-OTG5013 (配列番号11)とBsp E1部位と重複するOTG4565 (配列番号11)を用いたPCRにより増幅させる。PCRにより形成された断片をクレンジグDNAポリメラーゼで処理し、その後M13mp18のSma I部位中に導入して、M13TG6512を得る。PCR断片の配列を確認する。

ベクターpTG6533 (例6, 1)を酵素Eco RIおよびBsp E1で切断する。こうして処理されたベクターを、一方ではM13TG6512から単離されたpE1-Bsp E1断片、他方ではpKJ-1から単離されたEco RI-Pst I断片と結合させる。後者の断片はタクロチド524-1919間にあるネズミPGK遺伝子プロモーターの部分を含んでいるが、その配列はAiba et al. (1917, Gene, 60, 65-74)で報告されている。この工程ではpTG6552を生じ、タクロチド505で始まるAd5のE1領域の上流にネズミPGK遺伝子プロモーターを導入することができる。次に、Xho Iで形成された末端がクレンジグDNAポリメラーゼ処理後に平滑化されているXho I-Bam HI断片を、pBCMG-Neo (Hirose et al., 1989, J. Exp. Med., 169, 11-15) から複製する。ウサ

ビロモーターを有するpE2-Lac (Barr et al., 1990, Oncogene, 5, 691-699)から単離されたSma I-Hind III断片に結合させる。ベクターpTG6556を得る。一方、それはAd2の複製E2Aプロモーターを有するpE2-Lac-D9170 (Zachewski et al., 1985, EMBO J., 4, 1313-1318)から単離されたSma I-Hind III断片に結合させてもよい。この場合には、ベクターpTG6550を得る。

pTG6556を酵素Eco RIおよびBam HIで切断する。pTG6552から単離されたEco RI-Sac II断片とpTG6554から単離されたSac II-Bam HI断片をこれらの部位間に導入する。ベクターpTG6558を得る。pTG6550およびpTG6543 (例7, 1)で行う同様の工程では、各々pTG6557およびpTG6559を得る。

pTG6557およびpTG6558をEco RVで切断するが、唯一の部位は2つの複製カセット(pαc遺伝子およびE1領域)間に位置している。pBR322 (Bolivar et al., 1977)から単離された1,881Eco RV-Pvu II断片は、2プロモーター間の距離をあげるために、この部位中に組み込んでクローニングする。pTG6564およびpTG6565を各々得る。ベクターpTG6557、pTG6558、pTG6559、pTG6564およびpTG6565を細胞系

A549中にトランスフェクトする。前記のように、プロマイシン耐性クローンを選択し、E1領域の発現を確認する。E1発現クローンは、E1機能に欠陥があるアデノウィルスを増殖および増殖させるためである。E1発現産物の生産には細胞毒性効果を伴うが、サザン分析ではベクター再配列を実証できない。Ad-RSV- $\beta$ gal感染後、いくつかのクローンはウィルスを100倍以上増殖させることができる。

### 3. Highly Efficient Cell Transfection by Liposomes Using Replication Defective Adenovirus

これらのベクターは、前記のように、タクロチド505-4034にわたるAd5 E1領域の部分を含んでいる。しかしながら、E1A領域の配列の発現は、一方ではAd2 MLP最小プロモーター (TATAボックスおよび転写開始シグナル: タクロチド-34~+33) と他方ではGal4タンパク質による誘発性化であるGal110遺伝子の活性化配列からなる誘発性プロモーターのコントロール下におかれている。Gal4結合部位に相当する17タクロチド (17nt) の共通活性化配列はTobler et al. (1988, Cell, 52, 119) で特定されている。ウサギ $\beta$ -グロビン遺伝子の転写終結シグナルをE1B転写単位の3'末端におく。

17nt配列のダイマー (配列番号11および12) とその後Ad2 MLP最小プロモーターを含む、その5'

列をサザン分析により確認する。組込みプラスミド (pTG1643, pTG1660およびpTG1661) の実質的変化は、分析された生産クローンで実証できない。Gal4の存在下でE1A領域によりコードされた配列の発現の誘発性も (Gal4タンパク質の構成的発現を行うプラスミドでの形質転換により) 確認することができる。

約2のsalでAd-RSV- $\beta$ galによるいくつかの生産クローンの感染後、2つのA549-1660クローンはウィルスストックを100倍以上増殖させることができる。

### 例7: アデノウィルスの複製に必要な機能のすべてに関する補足系の形成

5' ITR, 3' ITRおよび包膜化領域を除いてAd5アデノウィルスゲノムの全部を含んだベクターを組み立てる。

ベクターpTG6528 (例6, 1) を酵素Pst IおよびBgl IIで切断するが、その間にはOTG5039およびOTG5040 (配列番号11および12) のオリゴヌクレオチドからなる標準プロトコールに従って化学的に合成されたDNA断片が挿入されている。オリゴヌクレオチド配列はPst I-クローニング部位を再形成せずにEcoRV部位を導入できるようにデザインされている。pTG1639を得て、これをEcoRV切断で直

末端にSal I部位およびその3'末端にBam HI部位を含んだ第一DNA断片を合成する。Sal I部位をクレノウDNAポリメラーゼ処理により平滑化する。別に、配列のベクターとその後に切断されたプロモーターを含み、その5'および3'末端にXba IおよびBam HI部位を含んだ第二DNA断片を合成する。Xba I切断後に、その末端をクレノウポリメラーゼ処理で平滑化する。

これらの断片の各々をpBov IIのBgl II部位中に導入して、pTG1656およびpTG1657を各々得る。次いで下記断片2断片、即ちpTG6552 (例6, 2) から導出されたPst I-Xba I断片とpTG6559 (例6, 12) から導出されたXba I-Bam HI断片をPst I-Bam HIで既に切断されたベクターの各々の中に導入する。pTG1660およびpTG1661を各々得る (図5)。

A549細胞をpTG1643 (pac遺伝子発現用のベクター) とpTG1660またはpTG1661でコトランスフェクトする。クローンをそれらのプロマイシン耐性について選択し、上記のように試験する。A549-1660およびA549-1661の約50%はE1領域の発現産物を生産する。しかしながら、生産には細胞毒性効果を伴い、細胞の形態的外観を減らす。

細胞ゲノムにおけるプラスミドの組み込みおよび再配

置化し、末端がクレノウDNAポリメラーゼ処理で平滑化されたXba I-Bam HI断片に結合させる。この断片はSV40ウィルス転写終結シグナルを有している。適切な制限部位で切られたシグナルを含むいずれのプラスミドもこの工程で用いてよい。

こうして形成されたベクターpTG1640をBam HIおよびBgl IIで切断し、pac遺伝子発現用のカセットを有する断片をベクターpBov II-Sal I/Sal IのBgl II部位中に導入する。pTG1641を得る。後者をNot Iで直線化し、クレノウDNAポリメラーゼで処理する。pBR322 (Bov II/Sal I, 1000) から導出されて更にクレノウDNAポリメラーゼで処理された0.276kb Bam HI-Sal I断片を導入する。これによりpTG1643を得る。

pTG1643をXho Iで直線化し、17ntダイマーとその後にTK-HSV-1遺伝子最小プロモーター (GluRIII) データバンクで参照番号70447と記述された配列のタクロチド303~450, 3'末端においてXho I部位で補充されている) を含んだXho Iハイブリッド断片をこの部位中に導入する。pTG1647を得るが、そこでは2×17nt-TK-HSV-1ハイブリッドプロモーターがpac遺伝子発現用のカセットと同方向に導入されている。

この組立体pTG1647は、タクロチド505~



Ad5ゲノムのE4領域(ヌクレオチド32800~35826)をいくつかの工程で再形成させる。ヌクレオチド33116~32800にわたる部分をAd5ゲノムDNAからプライマー対OTG5078およびOTG5079(配列番号11および11')でPCRにより合成し、その後M13TG130のEcoRV部位中に挿入して、M13TG1645を得る。

後者のBamHI-AflIII断片をAd5のAflIII-AvrII断片(ヌクレオチド33104~35463)との結合反応に付し、ベクター-pTG7457をBamHIおよびAvrIIで切断する。pTG1650を得る。

次いでE4領域を、Ad5ゲノムDNA調製物からプライマー-OTG5024およびOTG5025(配列番号11および11')を用いるPCRでヌクレオチド35826~35457'に相当する断片を得ることにより完成させる。この断片をM13mp18のSmaI部位に挿入して、M13TG1646を得る。AvrII-EcoRI断片を後者から単離し、pTG1650のAvrIIおよびEcoRI部位間に組み込んでクローニングする。pTG1652を得る。

Ad5のE4領域を含んだBamHI断片をpTG1652から単離し、pTG1643およびpTG6559(例6、2)のBamHI部位またはpTG6564

(例6、2)のSapI部位中に、その部位が平滑化された後に組み込んでクローニングし、pTG1653、pTG1654およびpTG1655(図6)を各々得る。

E1およびE4機能をイントランズで補える細胞系は、慣用的技術で:

(1)細胞系293へのpTG1653の形質転換、または

(2)細胞系A549へのpTG1654またはpTG1655の形質転換により作成する。

一般的に言えば、E1およびE4領域の産物の発現には細胞毒性効果を伴う。いくつかの293-1653クローンは、E1が欠失されたアデノウイルスとE4が欠失されたアデノウイルスの双方を補うことができる。

別法では下記のように行う。

ベクター-M13TG1646を、E4領域のプロモーターを欠失させてHpaI部位を挿入する目的から、変異体オリゴヌクレオチドOTG5991(配列番号14)で特定部位変異誘発に付す。変異ベクターはM13TG6522と命名する。それをPstIで切断し、ファージ4 DNAポリメラーゼとその後AvrIIで処理し、pTG1652(例8)の複製EcoRI(クレーノウ)-AvrII断片と結合させて、pTG6595を得る。

後者をHpaIで開裂し、BglIIおよびBamHI切断とクレーノウ処理後にpTG5913(図7)から得られた0.8kb断片を挿入する。pTG6596を得るが、そこではE4領域(32800~35826)はTKプロモーターのコントロール下にある。参考のため、pTG5913はTK-HSV-1遺伝子を育し、BglII-BamHI断片はこの遺伝子のプロモーターに相当する(Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 1441-1445)。

遂行して、ベクターpTG1643およびpTG6559(例6)をBamHIで直線化し、オリゴヌクレオチドOTG6141およびOTG6142(配列番号11および11')の組換えから得た合成断片を挿入して、pTG8508およびpTG8507を各々得る。

これらの後者をBamHIで開裂してから、E4発現用のカセットを含んだpTG6596の複製BamHI断片を導入する。ベクターpTG8512(図8)およびpTG8513(例9)を得る。

更に、同様に直線化されたベクターpTG8508またはpTG8507中へのpTG1652のBamHI断片の導入から、pTG8514およびpTG8515を各々得る(図10および11)。

pTG8512またはpTG8515でトランスフェクトされた細胞系はE4領域に欠陥があるアデノウイルス

スを補うことができ、一方pTG8513またはpTG8514トランスフェクションによるものはE1およびE4機能に欠陥があるアデノウイルスを増殖および増殖させるためにある。同様に、293細胞中へのpTG8512またはpTG8515のトランスフェクションでは、E1およびE4に欠陥があるアデノウイルスを補うことができる。

配列表

配列番号1

- (i) 配列の特徴  
 (A) 長さ: 30塩基対  
 (B) 型: 複製  
 (C) 鎖の数: 一本鎖  
 (D) トポロジー: 直鎖  
 (ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
 (iii) ハイボセティカル: No  
 (iii) アンチセンス: No  
 (iv) 起源  
 (A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
 (OTG4174)

(ii) 配列: 配列番号1

GTGACGCTTT TGGTGTCTTC GCGGGAAC

30

配列番号2

- (i) 配列の特徴  
 (A) 長さ: 30塩基対  
 (B) 型: 複製  
 (C) 鎖の数: 一本鎖  
 (D) トポロジー: 直鎖  
 (ii) 配列の種類: DNA (genomic)

配列番号4

- (i) 配列の特徴  
 (A) 長さ: 31塩基対  
 (B) 型: 複製  
 (C) 鎖の数: 一本鎖  
 (D) トポロジー: 直鎖  
 (ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
 (iii) ハイボセティカル: No  
 (iii) アンチセンス: No  
 (iv) 起源  
 (A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
 (OTG5021)

(ii) 配列: 配列番号4

GAAGGATCC CAGAGCTGT TTTGATTGG G

31

配列番号5

- (i) 配列の特徴  
 (A) 長さ: 30塩基対  
 (B) 型: 複製  
 (C) 鎖の数: 一本鎖  
 (D) トポロジー: 直鎖  
 (ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
 (iii) ハイボセティカル: No  
 (iii) アンチセンス: Yes

(iii) ハイボセティカル: No

(iii) アンチセンス: No

(iv) 起源

- (A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
 (OTG4173)

(ii) 配列: 配列番号2

ACCGAGTAAG ATTGTCTAG GCGCGCGGG

32

配列番号3

- (i) 配列の特徴  
 (A) 長さ: 33塩基対  
 (B) 型: 複製  
 (C) 鎖の数: 一本鎖  
 (D) トポロジー: 直鎖  
 (ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
 (iii) ハイボセティカル: No  
 (iii) アンチセンス: No  
 (iv) 起源  
 (A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
 (OTG4191)

(ii) 配列: 配列番号3

GCCATGCTC GCGGGAAGG GACTTGAAC GTT

33

(iv) 起源

- (A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
 (OTG5157)

(ii) 配列: 配列番号5

CCAGAAATAT CTTGCCACG GCGCGCGGG

34

配列番号6

- (i) 配列の特徴  
 (A) 長さ: 20塩基対  
 (B) 型: 複製  
 (C) 鎖の数: 一本鎖  
 (D) トポロジー: 直鎖  
 (ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
 (iii) ハイボセティカル: No  
 (iii) アンチセンス: No  
 (iv) 起源  
 (A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
 (OTG5564)

(ii) 配列: 配列番号6

GATCCGATAT CCGGTAAAC

35

配列番号7

- (i) 配列の特徴  
 (A) 長さ: 20塩基対

- (I) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直線  
(ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
(iii) ハイボセティカル: No  
(iii) アンチセンス: Yes  
(iv) 起源  
(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5565)

(ii) 配列: 配列番号7  
GATGGGTAA CGGATATCG

20

配列番号8

- (i) 配列の特徴  
(A) 長さ: 47塩基対  
(B) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直線  
(ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
(iii) ハイボセティカル: No  
(iii) アンチセンス: No  
(iv) 起源  
(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5892)

- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
(iii) ハイボセティカル: No  
(iii) アンチセンス: No  
(iv) 起源  
(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG59209)

(ii) 配列: 配列番号10  
ACGGTAGGAT CGGACGTCG TGAGCTCTC GCTTGCTC GCTCG 46

配列番号11

- (i) 配列の特徴  
(A) 長さ: 24塩基対  
(B) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直線  
(ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
(iii) ハイボセティカル: No  
(iii) アンチセンス: Yes  
(iv) 起源  
(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5891)

(ii) 配列: 配列番号11  
CAACCCGAT TCTAGAGAA CTG

24

(ii) 配列: 配列番号8

GTCTAGGAT CCACTGCTC CTCTCTTG TTTGGAGGT CACTGAG 47

配列番号9

- (i) 配列の特徴  
(A) 長さ: 47塩基対  
(B) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直線  
(ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
(iii) ハイボセティカル: No  
(iii) アンチセンス: Yes  
(iv) 起源  
(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5893)

(ii) 配列: 配列番号9

GTACTGAGC TCCAGGTC ACACCAATG GTGATGAT CAAATGG 47

配列番号10

- (i) 配列の特徴  
(A) 長さ: 46塩基対  
(B) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直線

配列番号12

- (i) 配列の特徴  
(A) 長さ: 35塩基対  
(B) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直線  
(ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
(iii) ハイボセティカル: No  
(iii) アンチセンス: Yes  
(iv) 起源  
(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG6079)

(ii) 配列: 配列番号12

CGCAGTTTC TCTGGGAT CACTTAAC TCAAT

35

配列番号13

- (i) 配列の特徴  
(A) 長さ: 38塩基対  
(B) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直線  
(ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
(iii) ハイボセティカル: No  
(iii) アンチセンス: Yes

- (iv) 起源:  
(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG6080)

(ii) 配列: 配列番号13  
TAAAGTACC AGGTAAAGAT CCCCCTGGTT TCTTGGG

30

## 配列番号14

- (i) 配列の特徴  
(A) 長さ: 21塩基対  
(B) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直鎖  
(ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
(iii) ハイボセティカル: No  
(iii) アンチセンス: No  
(iv) 起源:  
(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG6064)

(ii) 配列: 配列番号14  
GAACCGAAT TCTCTGGAA C

21

## 配列番号15

- (i) 配列の特徴  
(A) 長さ: 32塩基対

(ii) 配列: 配列番号16  
CAGTGAATC ATCATCAATA ATATACC

27

## 配列番号17

- (i) 配列の特徴  
(A) 長さ: 24塩基対  
(B) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直鎖  
(ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
(iii) ハイボセティカル: No  
(iii) アンチセンス: No  
(iv) 起源:  
(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5482)

(ii) 配列: 配列番号17  
AAATGGTCA CCGTGAATTA AAG

28

## 配列番号18

- (i) 配列の特徴  
(A) 長さ: 25塩基対  
(B) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直鎖

- (B) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直鎖  
(ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
(iii) ハイボセティカル: No  
(iii) アンチセンス: Yes  
(iv) 起源:  
(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG6065)

(ii) 配列: 配列番号15  
ACGATGAC CTCTCCACTT AACATTCAGT CG

32

## 配列番号16

- (i) 配列の特徴  
(A) 長さ: 27塩基対  
(B) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直鎖  
(ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
(iii) ハイボセティカル: No  
(iii) アンチセンス: Yes  
(iv) 起源:  
(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5481)

- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
(iii) ハイボセティカル: No  
(iii) アンチセンス: No  
(iv) 起源:  
(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5455)

(ii) 配列: 配列番号18  
ATCGGAATC AAGATGATTA GGTAC

25

## 配列番号19

- (i) 配列の特徴  
(A) 長さ: 28塩基対  
(B) 型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直鎖  
(ii) 配列の種類: DNA (genomic)  
(iii) ハイボセティカル: No  
(iii) アンチセンス: Yes  
(iv) 起源:  
(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5456)

(ii) 配列: 配列番号19  
ATCTCTAGA TTAAGGCATT TCTTTTC

28



配列番号 20

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 1.8 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセチカル: No

(iii) アンチセンス: No

(iv) 起源

- (A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5728)

(ii) 配列: 配列番号 20

TGTACAGGA GZACTAAG

配列番号 21

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 3.9 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセチカル: No

(iii) アンチセンス: Yes

(i) 型: 核酸

- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセチカル: No

(iii) アンチセンス: No

(iv) 起源

- (A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG6060)

(ii) 配列: 配列番号 23

ATATAAGAT CATTATTTTC ATTAGAAGCT

配列番号 24

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 2.4 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセチカル: No

(iii) アンチセンス: No

(iv) 起源

- (A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG6061)

(ii) 起源

- (A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5729)

(ii) 配列: 配列番号 21

CCGCATTAT TAACGCCGAC AAACGATCT TTAATCTTG

配列番号 22

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 3.6 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセチカル: No

(iii) アンチセンス: Yes

(iv) 起源

- (A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5730)

(ii) 配列: 配列番号 22

CCCGTTAAT TAATGCCGTA AAACGATCT CACCCG

配列番号 23

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 3.0 塩基対

(ii) 配列: 配列番号 24

TGTGTTGGTT TTTTGTCTGT TAAT

配列番号 25

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 3.0 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセチカル: No

(iii) アンチセンス: Yes

(iv) 起源

- (A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG6062)

(ii) 配列: 配列番号 25

TACACACAA AAACGCCCA CACATCTTA

配列番号 26

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 2.4 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: No

(iii) アンチセンス: Yes

(iv) 起源

(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG6063)

(ii) 配列: 配列番号26

ATGAAATAA TGATCTTTTA TTAT

24

配列番号27

(i) 配列の種類

(A) 長さ: 32塩基対

(B) 型: 複製

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: No

(iii) アンチセンス: No

(iv) 起源

(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG4564)

(ii) 配列: 配列番号27

TCCTGCAAT CTACTAGT GCGGAAGT TG

22

(iv) 起源

(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5013)

(ii) 配列: 配列番号29

TAACCTGCA GAGTCCAC GAGTAGAG

28

配列番号30

(i) 配列の種類

(A) 長さ: 21塩基対

(B) 型: 複製

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: No

(iii) アンチセンス: No

(iv) 起源

(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5015)

(ii) 配列: 配列番号30

CAACGCGAT GCCCCATGG G

21

配列番号31

(i) 配列の種類

(A) 長さ: 31塩基対

配列番号28

(i) 配列の種類

(A) 長さ: 23塩基対

(B) 型: 複製

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: No

(iii) アンチセンス: Yes

(iv) 起源

(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG4565)

(ii) 配列: 配列番号28

TCAGTCCGG AGACCGGGC GCC

23

配列番号29

(i) 配列の種類

(A) 長さ: 28塩基対

(B) 型: 複製

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: No

(iii) アンチセンス: No

(B) 型: 複製

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: No

(iii) アンチセンス: Yes

(iv) 起源

(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド  
(OTG5014)

(ii) 配列: 配列番号31

TAGGAGATCT GTTTTAAAC GCATTGGAG G

31

配列番号32

(i) 配列の種類

(A) 長さ: 34塩基対

(B) 型: 複製

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: No

(iii) アンチセンス: No

(iv) 起源

(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド

(ii) 配列: 配列番号32

CGGAGTACTG TCTCTCCGCG AGTACTGTCC TCCG

## 配列番号 33

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ: 34 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: No

(iv) アンチセンス: Yes

(v) 起源

(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド

(ii) 配列: 配列番号 33

CGGAGGACAG TACTCTCCGCG AGGACAGTAC TCCG

## 配列番号 34

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ: 16 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: No

(A) 長さ: 210 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: No

(iv) アンチセンス: No

(v) 起源

(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド

(OTG5024)

(ii) 配列: 配列番号 36

CTCTCTCCCA GCGAAATAG

## 配列番号 37

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ: 32 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: No

(iv) アンチセンス: Yes

(v) 起源

(iii) アンチセンス: No

(iv) 起源

(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド

(OTG5039)

(ii) 配列: 配列番号 34

TCTCGATAT CAGTCA

## 配列番号 35

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ: 24 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: No

(iv) アンチセンス: Yes

(v) 起源

(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド

(OTG5040)

(ii) 配列: 配列番号 35

GATCTGACTG ATATGACCA TCGA

## 配列番号 36

## (i) 配列の特徴

(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド

(OTG5025)

(ii) 配列: 配列番号 37

CCAGATGGAT CCGGCGGAG TAACCTGTAT GT

## 配列番号 38

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ: 31 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: No

(iv) アンチセンス: No

(v) 起源

(A) 生物名: 合成オリゴヌクレオチド

(OTG5078)

(ii) 配列: 配列番号 38

CTCCCGGATC CTTATGTTT CAGCTGTTT A

## 配列番号 39

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ: 20 塩基対

(B) 型: 核酸



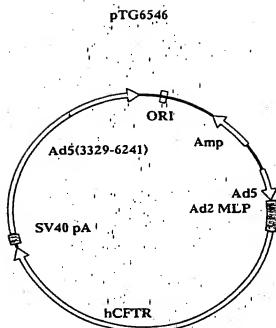


FIGURE 2

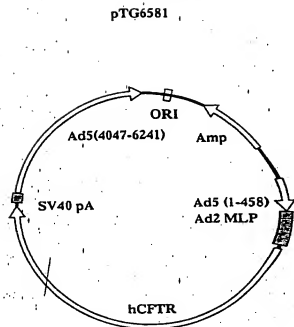


FIGURE 3

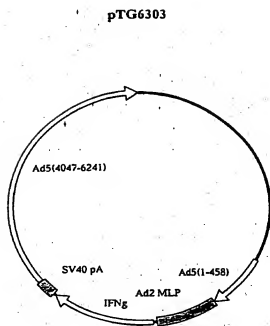


FIGURE 4

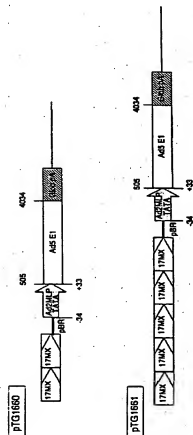


FIGURE 5

pTG5913

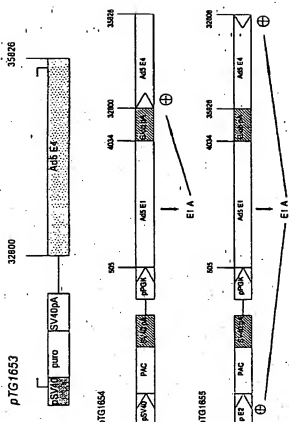


FIGURE 6

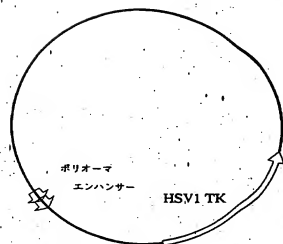


FIGURE 7

pTG8512

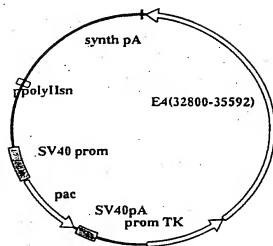


FIGURE 8

pTG8513

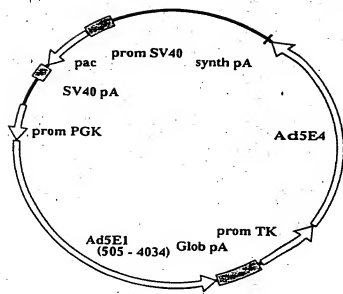



FIGURE 9



<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: right;">           International Application No. _____            PCT/TA 94/00524         </div> </div>
<b>Box 1</b> <i>Observations where certain elements have been considered as non-compliant</i> (Continuation of Box 1 of Form above)
This international search report has not been considered as compliant for various reasons under Article 17(2)(b) of the following convention: <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <b>1</b> <input checked="" type="checkbox"/> <i>Chinese text:</i>            Because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  <b>Remarks:</b> Although article 34 is directed to be a method for treatment of the human or animal body, the invention has been directed out and based on the alleged effects of the product (composition)         </div>
<b>2</b> <input type="checkbox"/> <i>Chinese text:</i> because they are part of the international application that do not, separately, meet the practical requirements to such an extent that it is meaningful to conduct a search on them, as stated, viz.
<b>3</b> <input type="checkbox"/> <i>Chinese text:</i> because they are dependent claims and are not directed to substances with the second and third elements of Rule 4, 6(b).
<b>Box 2</b> <i>Observations where unity of invention is lacking</i> (Continuation of Box 2 of Form above)
This international searching Authority found no unity of invention in this international application, as follows:
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <b>1</b> <input type="checkbox"/> All all required additional search items were timely paid by the applicant, this international search report covers all applicable claims.         </div>
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <b>2</b> <input type="checkbox"/> An inextendible search could be conducted reasonably providing no additional fee, this searching did not become program of any additional fee.         </div>
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <b>3</b> <input type="checkbox"/> An early notice of the requested additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all items drawn to the extent of the search fee paid, specifically items 1(a).         </div>
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <b>4</b> <input type="checkbox"/> The requested additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is submitted to the International Unit concerned in the claims. (Is covered by items 1(a).)         </div>

**Remarks on Prior art** ☐ The additional search items were contemplated by the applicant's program.  
☐ No power contemplated the purpose of additional search item.

[illegible]

<b>INTERNET MESSAGE</b>					
				Date: <b>01/06/84</b> Reference No: <b>PCT/FR 84/006241</b>	
<b>CIR 8</b>	<b>CIR 10</b>	<b>CIR 15</b>	<b>CIR 20</b>	<b>CIR 25</b>	<b>CIR 30</b>
<b>01/06/84</b>	<b>01/06/84</b>	<b>01/06/84</b>	<b>01/06/84</b>	<b>01/06/84</b>	<b>01/06/84</b>
<b>01/06/84</b>	<b>01/06/84</b>	<b>01/06/84</b>	<b>01/06/84</b>	<b>01/06/84</b>	<b>01/06/84</b>
Name of the person or company to whom the message is addressed: <b>IN 200</b>					
B. <b>INDICATIONS POUR L'ADRESSEUR LAUS REGISTRATION A PARIS</b>					
CIR 8 CIR 10 CIR 15 CIR 20 CIR 25 CIR 30					
CIR 8 CIR 10 CIR 15 CIR 20 CIR 25 CIR 30					
Name and address of the person or company to whom the message is addressed:					
Name and address of the person or company to whom the message is addressed:					
C. <b>CONTENU DU MESSAGE (CONTENTS OF THE MESSAGE)</b>					
a. <b>Classification du document (IN 200, IN 201, IN 202, IN 203, IN 204, IN 205, IN 206, IN 207, IN 208, IN 209, IN 210, IN 211, IN 212, IN 213, IN 214, IN 215, IN 216, IN 217, IN 218, IN 219, IN 220, IN 221, IN 222, IN 223, IN 224, IN 225, IN 226, IN 227, IN 228, IN 229, IN 230, IN 231, IN 232, IN 233, IN 234, IN 235, IN 236, IN 237, IN 238, IN 239, IN 240, IN 241, IN 242, IN 243, IN 244, IN 245, IN 246, IN 247, IN 248, IN 249, IN 250, IN 251, IN 252, IN 253, IN 254, IN 255, IN 256, IN 257, IN 258, IN 259, IN 260, IN 261, IN 262, IN 263, IN 264, IN 265, IN 266, IN 267, IN 268, IN 269, IN 270, IN 271, IN 272, IN 273, IN 274, IN 275, IN 276, IN 277, IN 278, IN 279, IN 280, IN 281, IN 282, IN 283, IN 284, IN 285, IN 286, IN 287, IN 288, IN 289, IN 290, IN 291, IN 292, IN 293, IN 294, IN 295, IN 296, IN 297, IN 298, IN 299, IN 300, IN 301, IN 302, IN 303, IN 304, IN 305, IN 306, IN 307, IN 308, IN 309, IN 310, IN 311, IN 312, IN 313, IN 314, IN 315, IN 316, IN 317, IN 318, IN 319, IN 320, IN 321, IN 322, IN 323, IN 324, IN 325, IN 326, IN 327, IN 328, IN 329, IN 330, IN 331, IN 332, IN 333, IN 334, IN 335, IN 336, IN 337, IN 338, IN 339, IN 340, IN 341, IN 342, IN 343, IN 344, IN 345, IN 346, IN 347, IN 348, IN 349, IN 350, IN 351, IN 352, IN 353, IN 354, IN 355, IN 356, IN 357, IN 358, IN 359, IN 360, IN 361, IN 362, IN 363, IN 364, IN 365, IN 366, IN 367, IN 368, IN 369, IN 370, IN 371, IN 372, IN 373, IN 374, IN 375, IN 376, IN 377, IN 378, IN 379, IN 380, IN 381, IN 382, IN 383, IN 384, IN 385, IN 386, IN 387, IN 388, IN 389, IN 390, IN 391, IN 392, IN 393, IN 394, IN 395, IN 396, IN 397, IN 398, IN 399, IN 400, IN 401, IN 402, IN 403, IN 404, IN 405, IN 406, IN 407, IN 408, IN 409, IN 410, IN 411, IN 412, IN 413, IN 414, IN 415, IN 416, IN 417, IN 418, IN 419, IN 420, IN 421, IN 422, IN 423, IN 424, IN 425, IN 426, IN 427, IN 428, IN 429, IN 430, IN 431, IN 432, IN 433, IN 434, IN 435, IN 436, IN 437, IN 438, IN 439, IN 440, IN 441, IN 442, IN 443, IN 444, IN 445, IN 446, IN 447, IN 448, IN 449, IN 450, IN 451, IN 452, IN 453, IN 454, IN 455, IN 456, IN 457, IN 458, IN 459, IN 460, IN 461, IN 462, IN 463, IN 464, IN 465, IN 466, IN 467, IN 468, IN 469, IN 470, IN 471, IN 472, IN 473, IN 474, IN 475, IN 476, IN 477, IN 478, IN 479, IN 480, IN 481, IN 482, IN 483, IN 484, IN 485, IN 486, IN 487, IN 488, IN 489, IN 490, IN 491, IN 492, IN 493, IN 494, IN 495, IN 496, IN 497, IN 498, IN 499, IN 500, IN 501, IN 502, IN 503, IN 504, IN 505, IN 506, IN 507, IN 508, IN 509, IN 510, IN 511, IN 512, IN 513, IN 514, IN 515, IN 516, IN 517, IN 518, IN 519, IN 520, IN 521, IN 522, IN 523, IN 524, IN 525, IN 526, IN 527, IN 528, IN 529, IN 530, IN 531, IN 532, IN 533, IN 534, IN 535, IN 536, IN 537, IN 538, IN 539, IN 540, IN 541, IN 542, IN 543, IN 544, IN 545, IN 546, IN 547, IN 548, IN 549, IN 550, IN 551, IN 552, IN 553, IN 554, IN 555, IN 556, IN 557, IN 558, IN 559, IN 560, IN 561, IN 562, IN 563, IN 564, IN 565, IN 566, IN 567, IN 568, IN 569, IN 570, IN 571, IN 572, IN 573, IN 574, IN 575, IN 576, IN 577, IN 578, IN 579, IN 580, IN 581, IN 582, IN 583, IN 584, IN 585, IN 586, IN 587, IN 588, IN 589, IN 590, IN 591, IN 592, IN 593, IN 594, IN 595, IN 596, IN 597, IN 598, IN 599, IN 600, IN 601, IN 602, IN 603, IN 604, IN 605, IN 606, IN 607, IN 608, IN 609, IN 610, IN 611, IN 612, IN 613, IN 614, IN 615, IN 616, IN 617, IN 618, IN 619, IN 620, IN 621, IN 622, IN 623, IN 624, IN 625, IN 626, IN 627, IN 628, IN 629, IN 630, IN 631, IN 632, IN 633, IN 634, IN 635, IN 636, IN 637, IN 638, IN 639, IN 640, IN 641, IN 642, IN 643, IN 644, IN 645, IN 646, IN 647, IN 648, IN 649, IN 650, IN 651, IN 652, IN 653, IN 654, IN 655, IN 656, IN 657, IN 658, IN 659, IN 660, IN 661, IN 662, IN 663, IN 664, IN 665, IN 666, IN 667, IN 668, IN 669, IN 670, IN 671, IN 672, IN 673, IN 674, IN 675, IN 676, IN 677, IN 678, IN 679, IN 680, IN 681, IN 682, IN 683, IN 684, IN 685, IN 686, IN 687, IN 688, IN 689, IN 690, IN 691, IN 692, IN 693, IN 694, IN 695, IN 696, IN 697, IN 698, IN 699, IN 700, IN 701, IN 702, IN 703, IN 704, IN 705, IN 706, IN 707, IN 708, IN 709, IN 710, IN 711, IN 712, IN 713, IN 714, IN 715, IN 716, IN 717, IN 718, IN 719, IN 720, IN 721, IN 722, IN 723, IN 724, IN 725, IN 726, IN 727, IN 728, IN 729, IN 730, IN 731, IN 732, IN 733, IN 734, IN 735, IN 736, IN 737, IN 738, IN 739, IN 740, IN 741, IN 742, IN 743, IN 744, IN 745, IN 746, IN 747, IN 748, IN 749, IN 750, IN 751, IN 752, IN 753, IN 754, IN 755, IN 756, IN 757, IN 758, IN 759, IN 760, IN 761, IN 762, IN 763, IN 764, IN 765, IN 76</b>					

國際調查報告		Accession No.	Classification
DOCUMENTS CONCERNING THE CHINESE TRANSFER CASE		ACT/PR 94/00524	
Page No.	Document Title (in Chinese and English)	Doc. No.	Page No.
	<p>HERNAN GENE TRANSFER vol. 219 1991 pages 11 - 21 "STATTON-PERRICARNEY, L. &amp; PERRICARNEY, M. "Gene transfer into cattle: the promise of adenozevins" volter page 84, slide 6</p>		1
A	<p>CELL. vol. 66, no. 1 10 Janvier 1992 CANNETT, AL D pages 112 - 116 "GENEFLEX, N.A. ET AL. "Is vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance gene to the transgenic rat" volter to document on center</p>		9-12
	<p>MO, A. 91 DEEGS (CHINA) 1 April 1993 volter reworded 3</p>		1
E	<p>MO, A. 94 12649 (GENETEX CORPORATION) 9 June 1994</p>	<p>1-10, 15, 24, 26, 27, 30-33, 42-43, 44-49, 50, 52-55</p>	
	<p>volter to document on center</p>		





## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## CLAIMS

---

### [Claim(s)]

1. although it is a virus vector including a manifestation unit with one or more virogenes and the manifestation unit is functionality in a complementary cell — a host cell — functionality — not but — and the virus vector which comes to contain one or more different-species regulator arrays.
2. Virus vector according to claim 1 which comes to contain one or more regulatory sequences to which manifestation unit activates manifestation of virogene under existence of inducer, and which can reach and can check manifestation of virogene under existence of/or repressor.
3. Virus vector according to claim 1 or 2 on which regulatory sequence can act on stability of imprint, expanding, transportation, and messenger RNA, or level of translation.
4. A regulatory sequence is the level of the promotor of a manifestation unit, and the virus vector according to claim 3 set further especially for the upstream of a TATA box.
5. A manifestation unit is TAR, RRE, GRE, PRE, ERE, and Gal4. Virus vector given in any 1 term of claims 1-4 which come to contain a UAS array and one or more regulatory sequences chosen as a list from the regulatory sequence of the regulatory sequence of a metallothionein gene, a bacteria tryptophan lactose, and the tetracycline operon.
6. Virus vector according to claim 5 which comes to contain one or more regulatory sequences originating in the tetracycline operon set for the upstream of promotor's TATA box in order to give promotor by whom tetracycline transformer activator (tTA) type inducer is activated, and manifestation unit is controlled by tetracycline.
7. Virus vector according to claim 5 which comes to contain one or more regulatory sequences originating in the tetracycline operon set on lower stream of a river of promotor's TATA box in order that manifestation unit may give promotor controlled by tetracycline repressor (tetR).
8. Virus vector given in any 1 term of claims 1-7 originating in virus

chosen from Herpes virus, cytomegalovirus, AAV (adeno-associated virus), poxvirus, and adenovirus.

9. Adenovirus vector according to claim 8 originating in hybrid containing adenovirus of Homo sapiens, dog, Tori, cow, rat, sheep, Buta, or the ape origin, or different adenovirus genome fragment of the origin.

10. The virus vector according to claim 8 or 9 which has a defect in a duplicate.

11. The adenovirus vector according to claim 10 which lacks all or some of E3 field by all or some of E1 fields, and the case at least.

12. An adenovirus vector given in any 1 term of claims 9-11 which come to contain one or more manifestation units with one or more virogenes of E2, E4, or L1-L5 field.

13. The adenovirus vector according to claim 12 which comes to contain a manifestation unit with one or more regulatory sequences originating in the tetracycline operon set for the upstream of a promotor's TATA box and the open reading frames (ORF) 6 and 7 of E4 field so that a tetracycline transformer activator (tTA) type inducer may be activated and the manifestation of a reading frame may be controlled by the tetracycline.

14. A virus vector given in any 1 term of claims 1-13 which come to contain the outpatient department nucleotide sequence put under control of an element required for a manifestation at a host cell.

15. The virus vector according to claim 14 chosen from the gene to which an outpatient department nucleotide sequence carries out the code of cytokine, a cell or a nucleus receptor, ligand, a coagulation factor, CFTR protein, an insulin, JISUTO lophine, a growth hormone, an enzyme, enzyme inhibitor, a polypeptide with the antitumor effectiveness, bacteria, a parasite or a virus especially the polypeptide that can prevent HIV infection, an antibody, a toxin, immunotoxin, and the marker.

16. Infectivity virion which comes to contain the virus vector indicated by any 1 term of claims 1-15.

17. The eukaryon host cell which comes to contain the infectivity virion indicated by the virus vector or claim 16 indicated by any 1 term of claims 1-15.

18. The complementary cell which comes to contain an inducer and/or repressor.

19. The complementary cell according to claim 18 which comes to contain the DNA fragment which carries out the code of an inducer and/or the repressor.

20. The complementary cell according to claim 18 or 19 originating in 293 systems.

21. It is Cell. Complementary [ of Adenovirus Vector Which Has Defect in E1 Function, Second at Least One Anaphase, or Initial Adenovirus

Function ] -- Business -- Put under control of an element required for a manifestation in a (i) complementary cell. The first cassette for the manifestation of all or some of E1 fields of adenovirus, It reaches. Put under control of an element required for a manifestation in (ii) complementary cell. The second cassette for the manifestation of the anaphase of adenovirus other than E1 field, or all or some of initial fields (the above-mentioned element contains one or more regulatory sequences indicated by any 1 term of claims 5-7)  
A complementary cell given in any 1 term of claims 18-20 which becomes by \*\*\*\*\*

22. The complementary cell according to claim 21, into which the element of the second manifestation cassette comes to contain the minimum promotor accompanying 5' end for the tetO array of 1-20.

23. The complementary cell according to claim 22 into which the element of the second manifestation cassette comes to contain the minimum promotor of the CMV virus (cytomegalovirus) origin accompanying 5' end for seven tetO arrays.

24. complementary [ of the adenovirus vector which has a defect in E1 and E4 function ] -- business -- a complementary cell given in any 1 term of claims 18-23 whose second manifestation cassettes it is a cell and are all or some of cassettes for a manifestation of E4 fields of adenovirus.

25. The complementary cell according to claim 24 which is the cassette for a manifestation of an array by which the second manifestation cassette carries out the code of the open reading frames 6 and 7 (ORF 6/7) of E4 field of adenovirus.

26. complementary [ of the adenovirus vector which has a defect in E1 and E2 function ] -- business -- a complementary cell given in any 1 term of claims 18-23 whose second manifestation cassettes it is a cell and are all or some of cassettes for a manifestation of E2 fields of adenovirus.

27. The complementary cell according to claim 26 which is the cassette for a manifestation of an array by which the second manifestation cassette carries out the code of the DBP protein (DNA-binding protein) of E2 field of adenovirus.

28. The complementary cell according to claim 26 which is the cassette for a manifestation of an array by which the second manifestation cassette carries out the code of the temperature sensitive mutant of the DBP protein of E2 field of adenovirus.

29. It is Cell. Complementary [ of Adenovirus Vector Which Has Defect in E1 Function, Other at Least Two Anaphases, or Initial Adenovirus Function ] -- Business -- Put under control of an element required for a manifestation in a complementary cell and the promotor preferably indicated by claims 5, 6, or 7. A complementary cell given in any 1 term of claims 18-28 which come to contain the third cassette for the

manifestation of the anaphase of adenovirus other than E1 field and the adenovirus field of the second manifestation cassette, or all or some of initial fields further.

30. It is Object for Complementation of Adenovirus Vector Which Has Defect in E1, E2, and E4 Function: Put under control of an element required for a manifestation in a (i) complementary cell. The first cassette for the manifestation of all or some of E1 fields of adenovirus, Put under control of an element required for a manifestation in a (ii) complementary cell. The second cassette for the manifestation of all or some of E4 fields of adenovirus, It reaches. (iii) Put under control of an element required for a manifestation in a complementation cell. The third cassette for the manifestation of all or some of E2 fields of adenovirus is included. The complementary cell according to claim 29 into which the above-mentioned element of the second and/or the third manifestation cassette comes to contain the minimum promotor of the promotor accompanied by at least one tetO array, and the CMV virus (cytomegalovirus) origin further especially accompanying 5' end for seven tetO arrays.

31. A complementary cell given in any 1 term of claims 18-30 whose potency of the virion produced by the complementary cell is more than  $5 \times 10^8$  pfu (plaque-forming unit)/ml.

32. A complementary cell given in any 1 term of claims 18-31 whose potency of the virion produced by the complementary cell is more than  $1 \times 10^{10}$  iu (infective unit)/ml.

33. In Order that Virus Vector Indicated by Any 1 Term of (I) Claims 1-15 May Obtain Transfected Complementary Cell It is introduced into the complementary cell which can carry out the complementation of the above-mentioned virus vector by in trans. It is cultivated under conditions suitable in order that the complementary cell by which the (ii) above-mentioned transfection was carried out may perform manifestation of virogene, and production of the above-mentioned infectivity virion. It reaches. (iii) The production approach including the above-mentioned infectivity virions being collected in a cell culture object of the infectivity virion indicated by claim 16.

34. The approach according to claim 33 by which a virus vector is an adenovirus vector and a complementary cell is indicated by claim 20.

35. In Order that (I) Adenovirus Vector May Obtain Infection Complementation Cell It is introduced into the complementary cell indicated by any 1 term of claims 21-32. It is cultivated under conditions suitable in order that the complementary cell by which the (ii) above-mentioned transfection was carried out may perform manifestation of virogene, and production of the above-mentioned infectivity virion. It reaches. (iii) The production approach of an infectivity adenovirus

particle including the above-mentioned infectivity virions being collected in a cell culture object according to claim 34.

36. The physic constituent which comes to contain the complementary cell indicated by any 1 term of the infectivity virion obtained using the virus vector indicated by any 1 term of claims 1-15, and the production approach which was indicated by claim 16 or was indicated by any 1 term of claims 33-35, the eukaryon host cell indicated by claim 17, or claims 18-32 combining the vehicle permitted from a pharmacological viewpoint.

37. It Can Set to Manufacture of Drugs for Therapy of Homo Sapiens by Gene Therapy, or Animal Object. The virus vector indicated by any 1 term of claims 1-15, the infectivity virion obtained using the production approach which was indicated by claim 16 or was indicated by any 1 term of claims 33-35, The therapy or prophylactic use of a complementary cell indicated by any 1 term of the eukaryon host cell indicated by claim 17 or claims 18-32.

38. Use according to claim 37 combined with repressor.

---

[Translation done.]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**